

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Katarina Zorić
620/MB

**ULOGA S-PROTEINA U
PROBIOTIČKOM DJELOVANJU
SOJA *Lactobacillus brevis* ZG1**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Blaženke Kos, red. prof., Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014- 09-7009).

Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr. sc. Blaženki Kos, red. prof. na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Jagodi Šušković, red. prof. na divnom odnosu prema studentima i trudu, te na prezentacijama i seminarima kojima se trudila približiti nam nastavni sadržaj.

Veliko hvala dr. sc. Kseniji Uroić, višoj asistentici i dipl. ing. Martini Marijanović, asistentici, na svim korisnim savjetima, velikoj motivaciji, nesebičnoj pomoći i divnoj atmosferi prilikom pripreme i izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i Ivanu na bezuvjetnoj ljubavi i podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ULOGA S-PROTEINA U PROBIOTIČKOM DJELOVANJU SOJA *Lactobacillus brevis* ZG1

Katarina Zorić, 620/MB

Sažetak: Veliku ulogu u probiotičkom djelovanju bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* imaju površinski S-proteini koji zbog izravnog kontakta s okolišem sudjeluju u bakterijskoj adheziji na različite supstrate i površine te imaju zaštitnu ulogu u nepovoljnim uvjetima. Cilj ovog rada bio je ispitati ulogu S-proteina u probiotičkom djelovanju soja *Lactobacillus brevis* ZG1, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišten soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji sadrži S-proteine, a kao negativna soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne sadrži S-proteine. Dokazano je da soj *L. brevis* ZG1 sadrži S-proteine kao i proteine koji su vezani na njih (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP) čija je funkcija još uvijek nepoznata. Dokazano je da S-proteini sojeva *L. helveticus* M92 i *L. brevis* ZG1 imaju zaštitnu ulogu u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Nadalje, ustanovljeno je da sojevi *L. helveticus* M92 i *L. brevis* ZG1 pokazuju, dok soj *L. plantarum* D13 ne pokazuje proteolitičku aktivnost u obranom mlijeku. Ispitivanjem adhezije na mucin ustanovljena je znatno slabija adhezija nakon uklanjanja S-proteina i SLAP proteina s površine ispitivanih bakterijskih stanica.

Ključne riječi: probiotici, S-proteini, SLAP, *Lactobacillus brevis*, adhezija

Rad sadrži: 49 stranica, 17 slika, 4 tablice, 84 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: red. prof. dr. sc. Blaženka Kos

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ksenija Uroić, viši asistent i dipl. ing. Martina Marijanović, asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Red. prof. dr. sc. Jagoda Šušković, red. prof.
2. Red. prof. dr. sc. Blaženka Kos, red. prof.
3. Izv. prof. dr. sc. Jadranka Frece, izv. prof.
4. Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić, izv. prof.

Datum obrane: 08. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
And Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

THE ROLE OF S-LAYER PROTEINS IN PROBIOTIC MECHANISM OF ACTION IN STRAIN *Lactobacillus brevis* ZG1

Katarina Zorić, 620/MB

Abstract: S-layer proteins have a huge role in probiotic mechanism of action in *Lactobacillus* genus of lactic acid bacteria. These proteins, which have direct contact with the environment of the cells, are involved in bacterial adhesion to different substrates and surfaces and also have a protective role in unfavorable conditions. The aim of this study was to examine the role of S-proteins in probiotic mechanism of action in the strain *Lactobacillus brevis* ZG1, where the strain of *Lactobacillus helveticus* M92 which contains S-proteins was used as a positive control, and the strain of *Lactobacillus plantarum* D13 which does not contain S-proteins was used as a negative control. It has been shown that the strain *L. brevis* ZG1 contains S-protein as well as proteins that are linked to them (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP), whose function is still unknown. It has also been proven that S-proteins of the strains *L. helveticus* M92 and *L. brevis* ZG1 have a protective role in the unfavorable conditions of the gastrointestinal tract. Furthermore, it has been found that the strains *L. helveticus* M92 and *L. brevis* ZG1 show proteolytic activity in skimmed milk, while *L. plantarum* D13 doesn't. The examination of the mucin-adhesion ability has shown significantly weaker adhesion ability after the removal of the S-layer proteins and SLAP proteins from the surface of the tested bacterial cells.

Keywords: probiotics, S-layer proteins, SLAP, *Lactobacillus brevis*, adhesion

Thesis contains: 49 pages, 17 figures, 4 tables, 84 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Blaženka Kos, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Ksenija Uroić, Senior Assistant and BSc Martina Marijanović, Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Jadranka Frece*, Associate professor
4. PhD. *Jasna Mrvčić*, Associate professor

Thesis defended: 08 July 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROBIOTIČKI KONCEPT I RAZVOJ PROBIOTIKA	2
2.2. S-PROTEINI I NJIHOVA ULOGA U PROBIOTIČKOM DJELOVANJU	3
2.3. PREDNOSTI KORIŠTENJA PROBIOTIKA	5
2.4. MEHANIZAM PROBIOTIČKOG DJELOVANJA	7
2.4.1. Proizvodnja inhibitornih spojeva	9
2.4.2. Blokiranje mjesta za adheziju	10
2.4.3. Kompeticija za nutrijente	11
2.4.4. Imunomodulacijski učinci	12
2.4.5. Degradacija receptora toksina	13
2.4.6. Antiproliferirajući učinci	13
2.4.7. Modulacija crijevne mikrobiote	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Radni mikroorganizmi	16
3.1.2. Hranjive podloge	16
3.1.3. Kemikalije	17
3.1.4. Aparatura i pribor	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	19
3.2.2. Gel elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)	19
3.2.3. Ekstrakcija proteina vezanih na S-sloj (eng. Surface-layer associated proteins, SLAP) pomoću LiCl	21

3.2.4. Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima.....	22
3.2.5. Analiza proteolitičke aktivnosti	23
3.2.6. Adhezija na mucin.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. USPOREDBA ISPITIVANIH <i>Lactobacillus</i> SOJEVA PRIMJENOM GEL ELEKTROFOREZE U DENATURIRAJUĆEM GRADIJENTU (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).....	25
4.2. EKSTRAKCIJA PROTEINA VEZANIH NA S-SLOJ (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP).....	27
4.3. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE BRZINE RASTA ISPITIVANIH <i>Lactobacillus</i> SOJEVA U RAZLIČITIM STRESNIM UVJETIMA	30
4.4. ANALIZA PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI ODABRANIH <i>Lactobacillus</i> SOJEVA	34
4.5. ADHEZIJA NA MUCIN ODABRANIH <i>Lactobacillus</i> SOJEVA.....	36
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1.UVOD

Probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se uzmu u odgovarajućoj količini doprinose zdravstvenoj dobrobiti ljudskog organizma te imaju značajan terapijski i/ili profilaktični potencijal u različitim gastrointestinalnim ili drugim poremećajima/bolestima. Sojevi koji se najčešće koriste kao probiotici su bakterije mliječne kiseline, bifidobakterije i kvasac *Saccharomyces boulardii*.

Unatoč intenzivnim istraživanjima mehanizama djelovanja probiotika koji su odgovorni za zdravstvenu dobrobit, oni još uvijek nisu u potpunosti jasni. Predloženo je nekoliko važnih mehanizama djelovanja kao što su poboljšanje crijevne epitelne barijerne funkcije, imunomodulacijski učinci, degradacija receptora toksina, kompeticija za nutrijente, proizvodnja inhibitornih spojeva, antiproliferirajući učinci, blokiranje mjesta za adheziju, modulacija crijevne mikrobiote i mnoge druge. Međutim, kako bi se utvrdile neke zdravstvene tvrdnje za probiotike i kako bi se razjasnio njihov temeljni mehanizam djelovanja potrebno je provesti eksperimentalna istraživanja na životinjskim modelima i studijama na ljudima.

Komponente bakterijskih stanica kao što su DNA ili peptidoglikan također mogu biti uključeni u funkcionalni mehanizam probiotika. Učinkovitost probiotika za potencijalnu primjenu kao profilaktika ili tretirajućih sredstava za određenu bolest je određeno njegovom sposobnošću da posjeduje sve ili većinu prethodno predloženih mehanizama djelovanja.

Veliku ulogu u probiotičkom djelovanju imaju S-proteini. S-proteini se nalaze u nekoliko vrsta bakterija roda *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. helveticus* i *L. hilgardii* te kod bakterijskih vrsta iz nekadašnje *Lactobacillus acidophilus* grupe (Johnson i sur., 1980). Zbog direktnog kontakta sa okolišom imaju 2 uloge - ulogu u bakterijskoj adheziji na različite supstrate i površine te zaštitnu ulogu u nepovoljnim uvjetima.

Cilj ovog rada bio je ispitati ulogu S-proteina u probiotičkom djelovanju soja *Lactobacillus brevis* ZG1. Pritom je kao pozitivna kontrola korišten soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji sadrži S-proteine, a kao negativna soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne sadrži S-proteine. Provedena je gel elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) s ciljem dokazivanja razlika među bakterijskim vrstama ispitivanih sojeva, ekstrakcija proteina vezanih na S-proteine (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP) čija je funkcija nepoznata i turbidimetrijsko određivanje brzine rasta bakterija mliječne kiseline u različitim nepovoljnim uvjetima. Ispitana je također njihova proteolitička aktivnost i sposobnost adhezije na mucin.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. PROBIOTIČKI KONCEPT I RAZVOJ PROBIOTIKA

Koncept probiotika kao korisnih mikroorganizama koji zamjenjuju štetne mikrobe u crijevima sa korisnima datira još iz vremena Elie Metchnikoffa (1845-1916), ruskog profesora biologije, koji je radio kao direktor na Institutu Pasteur u Parizu. Elie Metchnikoff se smatra začetnikom probiotičkog koncepta koji je, zaintrigiran dugovječnošću bijele populacije i njihovom velikom potrošnjom fermentiranog mlijeka, predložio da organizmi koji proizvode kiseline u fermentiranim mliječnim proizvodima mogu spriječiti „onečišćenja“ u debelom crijevu i dovesti do produljenja životnog vijeka potrošača (Smug i sur., 2014). Iako su Metchnikoffove ideje jasno povezane sa bakterijama mliječne kiseline u mliječnim proizvodima, interes drugih znanstvenika se uskoro okrenuo prema bakterijama mliječne kiseline crijevnog podrijetla. Ovo opažanje je pokrenulo intezivan interes za istraživanje probiotika. Probiotički koncept se uz bakterije izolirane iz fermentiranih mliječnih proizvoda proširio i na one crijevnog porijekla.

Riječ „probiotik“ dolazi od grčkih riječi „pro“ i „bios“ što znači „za život“. Fuller (1989) je probiotike definirao kao „živi mikrobnii dodatak prehrani koji pozitivno utječe na domaćina poboljšavajući njegovu mikrobnu ravnotežu“. Od tada, nekoliko širokih definicija je predloženo od strane stručnjaka (Schrezenmeir i De Vrese, 2001) te od Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (eng. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organization, WHO) (FAO/WHO, 2001). Prema ovim definicijama, probiotici su „živi mikroorganizmi koji, kada se administriraju u odgovarajućim količinama, iskazuju zdravstvenu dobrobit za domaćina“, stimulirajući rast ostalih mikroorganizama, modulirajući mukoznu i sistemsku imunost i poboljšavajući nutritivnu i mikrobnu ravnotežu u probavnom traktu. Probiotici uglavnom uključuju sojeve bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), ali također uključuju i određene kvasce (npr. *Saccharomyces boulardii*) i neke druge bakterijske i kvaščeve vrste (Bermudez-Brito i sur., 2012; Bajaj i sur., 2015).

Bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus* su grupa Gram-pozitivnih, nesporelirajućih, anaerobnih i mikroaerofilnih bakterija niskog G+C sadržaja koje pripadaju koljenu *Firmicutes* (Pot i sur., 1994). To su striktno fermentativne bakterije koje se ovisno o produktu fermentacije dijele na homofermentativne (proizvode samo mliječnu kiselinu) i heterofermentativne (proizvode mliječnu kiselinu, ugljikov dioksid, etanol i/ili octenu kiselinu) (Hammes i Vogel, 1995; Pot i sur., 1994).

2.2. S-PROTEINI I NJIHOVA ULOGA U PROBIOTIČKOM DJELOVANJU

S-sloj je parakristalična dvodimenzionalna površina koja se sastoji od identičnih (gliko)proteinskih podjedinica koje oblažu površinu stanica Gram-pozitivnih, Gram-negativnih bakterija i *Arhea* (Sleytr i sur., 2001). Podjedinice S-proteina su nekovalentnim vezama povezane sa površinom stanica. Proteinske podjedinice su bogate kiselim i hidrofobnim aminokiselinama, ali su siromašne aminokiselinama koje sadrže sumpor (Sára i Sleytr, 2000). Geni koji kodiraju za podjedinice koje čine S-proteine su visoko eksprimirani, ali je niska sveukupna sličnost u sekvencama i zbog tog razloga se potvrđuje prisutnost S-proteina i dalje zasniva na elektronskoj mikroskopiji (Sleytr i Beveridge, 1999). S-proteini se nalaze u nekoliko vrsta bakterija roda *Lactobacillus*, ali ne u svima. S-proteini su nađeni u: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus hilgardii* te kod bivše *Lactobacillus acidophilus* grupe (Johnson i sur., 1980). Imaju molekulsku masu u rasponu od 40-200 kDa (Sára i Sleytr, 2000). U usporedbi sa S-proteinima ostalih Gram pozitivnih bakterija, one kod roda *Lactobacillus* su jedinstvene, zbog toga što ne posjeduju SLH (eng. S-layer homologous) domenu (Boot i Pouwels, 1996), namanji su od svih poznatih S-proteina (25-71 kDa) i imaju visoku pI vrijednost od 9.35-10.4 (Åvall-Jääskelläinen i Palva, 2005). U direktnom su kontaktu sa okolišom i stoga imaju 2 uloge:

1. Uloga u bakterijskoj adheziji na različite supstrate i površine

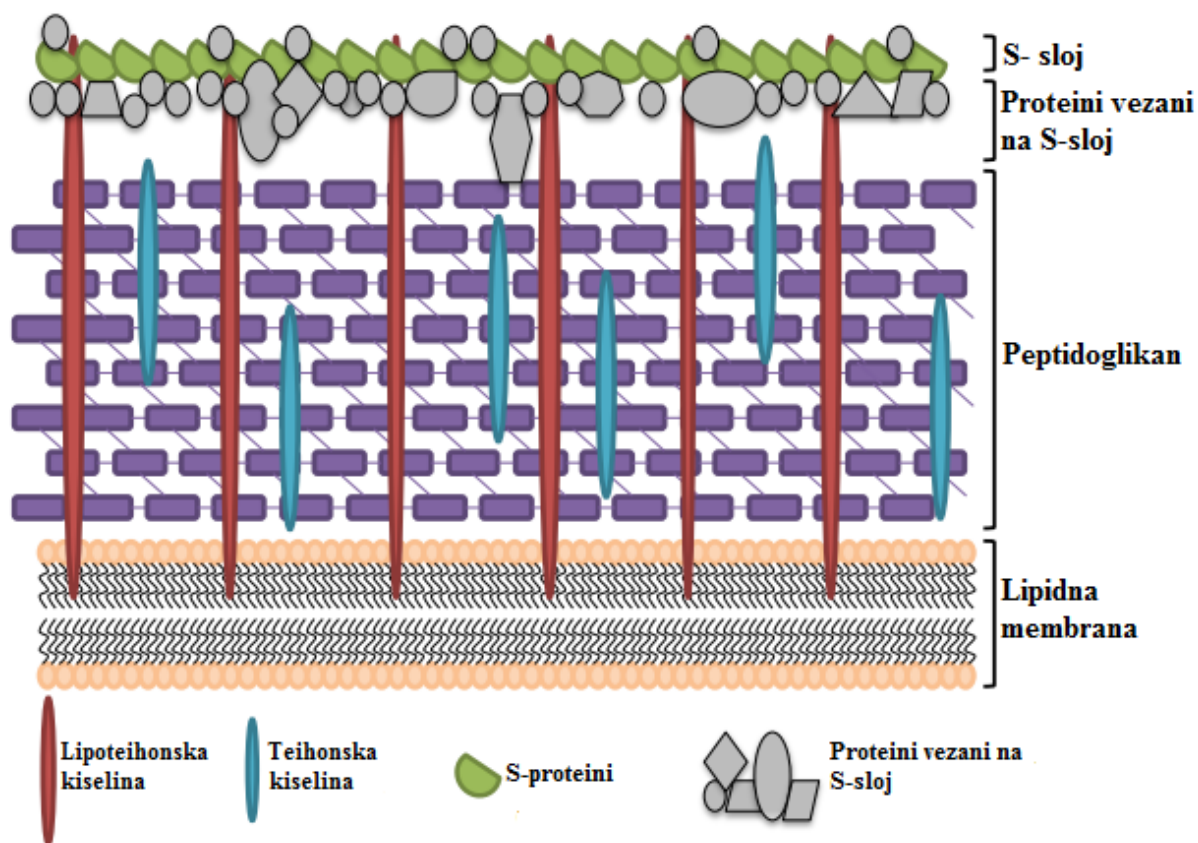
Agregacija i adhezija su složeni procesi koji uključuju nekoliko molekula prisutnih na površini stanične stijenke (Slika 1) kao što su: teihoninske i lipoteihoninske kiseline, (gliko)proteini (Li i sur., 2015). S-proteini sudjeluju u auto- ili koagregaciji bakterija, vezanju na različite površine, uključujući gastrointestinalni mucin, makromolekule izvanstaničnog matriksa i epitelne stanice (Sakakibara i sur., 2007; Hynönen i Palva, 2013; Shimotahira i sur., 2013; Zhang i sur., 2013), formiranju biofilma i interakciji s imunološkim sustavom.

2. Uloga S-proteina kao mehanička barijera u nepovoljnim uvjetima

S-proteini sudjeluju u otpornosti bakterija na različite nepovoljne uvjete, uključujući i one u gastrointestinalnom sustavu. Otpornost S-proteina na ekstremne okolišne uvjete kao što su visoka temperatura, nizak pH ili visoka ionska jakost, ima potencijalnu ulogu u zaštiti i stabilizaciji stanica (Engelhardt i Peters, 1998; Claus i sur., 2002; Engelhardt, 2007). S-proteini su direktno izloženi ekstremnim uvjetima, i stoga osiguravaju korisne informacije o

molekularnim mehanizmima stabilizacije pri visokim temperaturama. Termalna stabilizacija S-proteina se pripisuje njihovoj postranslacijskoj modifikaciji (Engelhardt i Peters, 1998).

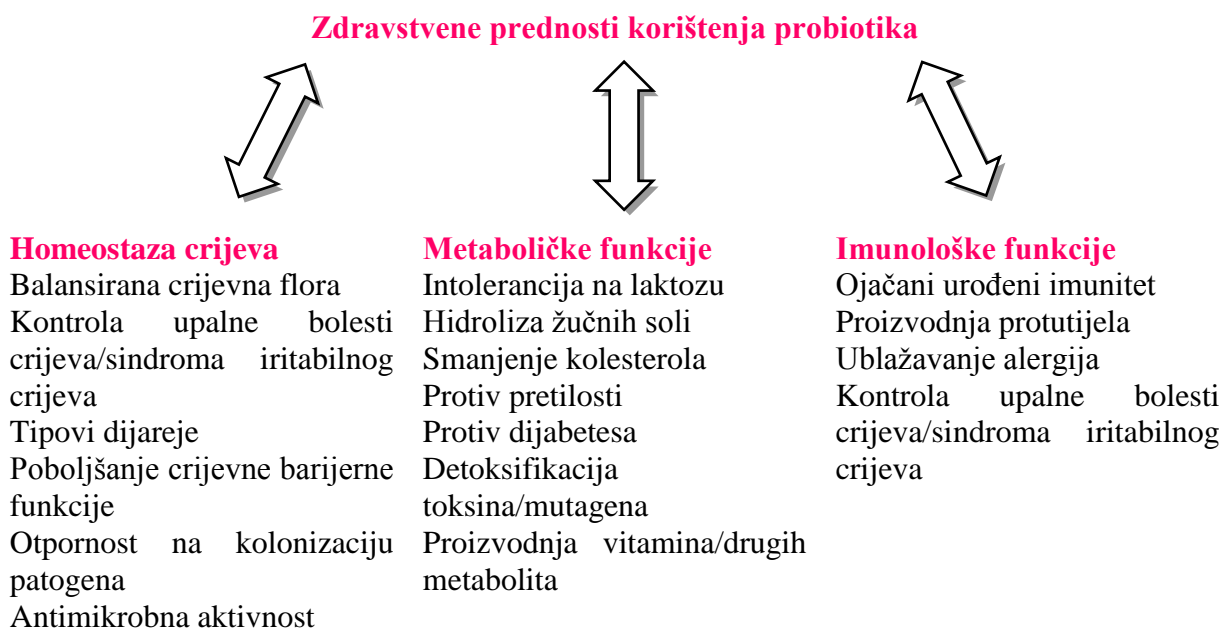
S-proteini se mogu odvojiti s površine Gram-pozitivnih bakterija tretmanom sa visokim koncentracijama gvanidin hidroklorida ili litijevog klorida, koji cijepaju vodikove veze između S-proteina i sekundarne stanične stijenke polisaharida (Sára i Sleytr, 2000). Uz S-proteine mogu se nalaziti i SLAP (eng. Surface-Layer Associated Proteins) proteini koji imaju nepoznatu funkciju, ali mogu pomoći u razumijevanju djelovanja probiotika, biologije stanične stijenke, i imunomodulacije (Goh i sur., 2009).



Slika 1. Shematski prikaz lokalizacije proteina vezanih na S-sloj kod *L. acidophilus* NCFM. Stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterija se sastoji od debelog sloja peptidoglikana (ljubičasto), koji je stabiliziran sa teihonskom kiselinom i vezan na lipidnu membranu sa lipoteihonskom kiselinom. S-sloj se sastoji od S-proteina (zeleno) i proteina koji su vezani na S-sloj (Preuzeto od Johnson i sur., 2013)

2.3. PREDNOSTI KORIŠTENJA PROBIOTIKA

Zdravstvene prednosti konzumacije probiotika su se opsežno istraživale na modelima životinja i u različitim studijama na ljudima. Smatra se da sudjeluju u prevenciji i liječenju bolesti diareje (akutna infantilna diareja, diareja povezana sa antibioticima, bolničke infekcije), u prevenciji sistemskih infekcija, u liječenju upalnih bolesti crijeva, imunomodulaciji, prevenciji i liječenju alergija, u liječenju kolesterolemije, ublažavanju intolerancije na laktozu i smatra se da posjeduju antitumorske učinke (Gill i Guarner, 2004) (Slika 2). Veliki zdravstveni potencijal probiotika motiviralo je prehrambenu industriju na razvoj probiotičke hrane (Liong i sur., 2011).



Slika 2. Zdravstvene prednosti korištenja probiotika (Prilagođeno prema Bajaj i sur., 2015).

Zdravstvene prednosti korištenja probiotika se ne mogu generalizirati zbog toga što postoje velike razlike na razini roda, vrsta i sojeva probiotičkih bakterija što utječe na njihova svojstva te doprinosi zdravlju. Zdravstvene prednosti jednog soja se ne mogu pripisati drugim sojevima bez prethodnog provođenja eksperimenata (Bermudez-Brito i sur., 2012). Osim toga jedan probiotik ne mora posjedovati sve predložene zdravstvene dobrobiti. Jednosojni probiotici se definiraju kao probiotici koji sadrže jedan soj određene vrste, dok višesojni probiotici sadrže više od jednog soja iste ili vrlo bliske vrste, na primjer *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei* (Timmerman i sur., 2004).

Probiotički soj mora imati sposobnost preživljavanja želučanih i žučnih sokova tijekom prolaska kroz gornji dio gastrointestinalnog trakta, prije proliferacije i kolonizacije u crijevima. Metabolički produkti sojeva ne bi smjeli imati patogene, toksične, mutagene, ili kancerogene učinke na domaćina. Probiotički sojevi moraju biti genetički stabilni bez mehanizma prijenosa plazmida. Nadalje, probiotici moraju imati dobra tehnološka svojstva za izdržavanje i preživljavanje uvijeta tijekom proizvodnje, prerade, skladištenja i transporta prehrambenih proizvoda, te moraju imati zadovoljavajuću razinu vijabilnosti u vrijeme konzumacije (Schiffrin i Blum, 2001).

Veliki zdravstveni izazov u razvijenim zemljama je proizvodnja hrane koja je obogaćena fiziološkim funkcionalnim komponentama koje pojačavaju i održavaju visoki imunitet. Ovaj izazov je dodatno zakompliciran visokim postotkom pothranjenosti, AIDS-om, neodgovarajućom prehranom i lošim zdravstvom. Industrijalizacija, urbanizacija, ekonomski razvoj i globalizacija tržišta, imaju značajan utjecaj na zdravlje i nutritivni status populacija u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Za direktnu borbu protiv ovih izazova, WHO zagovara primjenu alternativnih strategija za kontrolu bolesti kao što su profilaktički i terapijski potencijal probiotika (FAO/WHO, 2001).

Probiotički pripravci su bazirani najčešće na mliječnim proizvodima koji su vrlo hranjivi i zadovoljavaju nutritivne potrebe izbirljivih bakterija mliječne kiseline (BMK), te su veoma prihvaćeni među potrošačima. U širokom rasponu mliječnih probiotičkih proizvoda ističu se mlijeko, sladoled, jogurt i sir (Champagne i sur., 2005; Kailasapathy i sur., 2008; Daneshi i sur., 2013). Fizikalno-kemijska svojstva hrane koja se koriste za unos probiotika i koji utječu na opstanak probiotika tijekom želučanog transporta su: puferska svojstva, aktivnost vode, redoks potencijal, sastav proteina, šećera, pH i temperatura. Sirevi imaju veliki potencijal za unos probiotika zbog njihovih specifičnih kemijskih i fizikalnih svojstava (Karimi i sur., 2011). Sladoled i smrznuti mliječni proizvodi prikladni su kao matriks za probiotičke bakterije zbog njihove niske temperature skladištenja i manjeg rizika od toplinskih šokova (Cruz i sur., 2009). Mliječni deserti poput čokoladnog moussa su također uzeti u obzir kao potencijalna sredstva za unos probiotika (Possemiers i sur., 2010). Međutim, neki negativni aspekti kao što su visok sadržaj kolesterola, kazein i obaveza pohranjivanja na niskim temperaturama, potaknuli su razvoj ne-mliječnih prehrambenih proizvoda kao sredstva za unos probiotika, među kojima se ističu kokosovo mlijeko, povrtni/voćni sokovi/pića,

prehrambene pločice te proizvodi na bazi soje i žitarica (Ranadheera i sur., 2010). Razvoj novih ne-mliječnih probiotičkih prehrambenih proizvoda zahtijeva detaljnu analizu tržišta kako bi se ispitao interes potrošača za proizvodima koji su istovremeno ukusni i zdravi (Rad i sur., 2014).

2.4. MEHANIZAM PROBIOTIČKOG DJELOVANJA

Probiotici iskazuju pozitivan učinak na zdravlje domaćina kroz brojne mehanizme kao što su utjecaj na sastav i/ili funkciju komensalne mikrobiote mijenjanjem imunološkog i epitelnog sustava domaćina (Hyland i sur., 2014) te borba protiv toksina ili štetnih produkata mikrobnog, prehrambenog ili domaćinovog porijekla (Rupa i Mine, 2012; Sanders i sur., 2014).

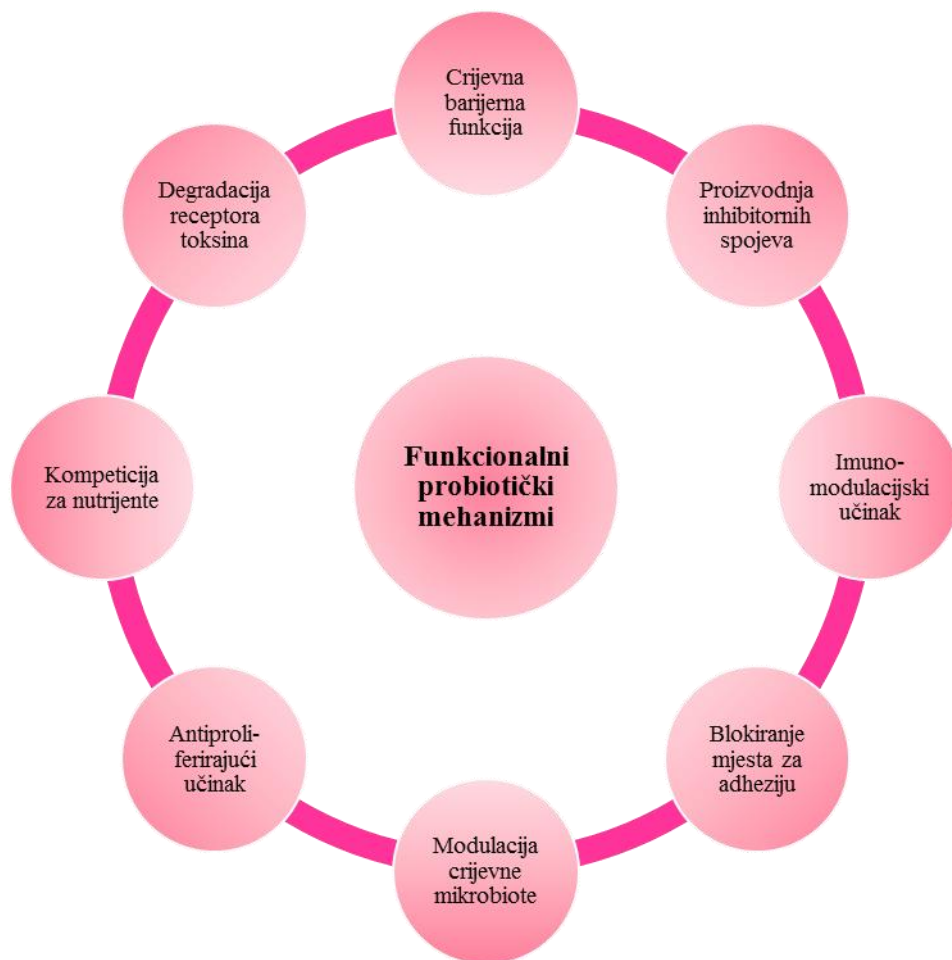
Unatoč intenzivnim istraživanjima na području probiotika, zasad nema velikog napretka u identifikaciji mehanizama kojima probiotički sojevi poboljšavaju zdravlje domaćina. Učinkovitost probiotika često ovisi o mehanizmu kojim vrše svoju aktivnost te je stoga poželjan intenzivan fokus istraživača na mehanističke detalje djelovanja probiotika na zdravlje domaćina. Slika 3 prikazuje neke od općih funkcionalnih mehanizama kojima se pokušalo objasniti kako probiotici mogu zaštititi domaćina od zdravstvenih poremećaja.

Modulacijom mukozne barijere koju čine mukozni sloj, epitelna mukozna vlakna i imunološke stanice koje se nalaze ispod epitela, može se pozitivno utjecati na barijernu robusnost i posljedično na stanje bolesti (Liu i sur., 2011; Hyland i sur., 2014). Na staničnoj razini, epitelne stanice su u središtu barijernog učinka jer primaju molekularne signale iz lumena crijeva i razmjenjuju ih sa imunološkim stanicama, ali i komuniciraju sa cijelim organizmom pomoću cirkulirajućih signalnih molekula. Crijevna barijera igra ključnu ulogu u patogenezi brojnih gastrointestinalnih bolesti kao što su upalne bolesti crijeva (eng. IBD-inflammatory bowel disease), sindrom iritabilnog crijeva (eng. IBS-irritable bowel syndrome), celijakija i infektivni enterokolitis (Blaut i Klaus, 2012). Odabir probiotičkih sojeva koji mogu ojačati crijevnu barijeru je bitna strategija sa jasnim utjecajem na različite tipove bolesti (van Hemert i sur., 2013).

Dokazano je da probiotički sojevi utječu na isto tkivo (u ovom slučaju epitelno) različitim putevima, ali svi doprinose očuvanju barijernog učinka. U kliničkom smislu, primjena *Lactobacillus plantarum* u tankom crijevu zdravih ispitanika potiče strukturne promjene u epitelnim čvrstim vezama, što rezultira povećanjem čvrstih veza specifičnih okludin proteina i ZO-1 (lat. *zonula occludens* 1) proteina. Gubitak integriteta čvrstih veza rezultira povećanjem crijeвне permeabilnosti za makromolekule što je povezano sa nekoliko bolesti kao što su IBD, IBS, i celijakija (Sawada i sur., 2003).

Pokazalo se da tretmani sa nekoliko sojeva *Lactobacillus* kao što su *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, i *L. rhamnosus* induciraju različite genske regulatorne mreže i puteve u ljudskoj mukozi uključujući povećanje regulacije IL-1b, aktivatora signalizacijske kaskade NF-kB, koja može dovesti do transkripcije gena uključenih u limfogenezu i sazrijevanje B-stanica, čime se doprinosi unaprijeđenju barijerne funkcije. Različita ekspresija gena koji sudjeluju u zacjeljivanju rana i oporavku, angiogenezi, IFN odgovoru, signaliziranju kalcijem i homeostazi iona bitna je za vaskularizaciju epitelnih stanica (van Baarlen i sur., 2011). Uočene promjene u transkripcijskim mrežama pokazuju sličnost sa odgovorima dobivenim sa bioaktivnim molekulama i lijekovima, što ukazuje na potencijanu primjenu probiotika u područjima terapijskih i/ili profilaktičkih prehrambenih režima.

Predloženo je nekoliko važnih mehanizama djelovanja probiotika kao što su: poboljšanje crijeвне epitelne barijerne funkcije, proizvodnja inhibitornih spojeva, blokiranje mjesta za adheziju, kompeticija za nutrijente, imunomodulacijski učinci, degradacija receptora toksina, antiproliferirajući učinci, modulacija crijeвне mikrobiote. Učinkovitost probiotika za potencijalnu primjenu kao profilaktika ili tretirajućih sredstava za određenu bolest je određeno njegovom sposobnošću da posjeduje sve ili većinu ovih karakterističnih obilježja.



Slika 3. Predloženi funkcionalni mehanizmi probiotika (Prilagođeno prema Bajaj i sur., 2015).

2.4.1. Proizvodnja inhibitornih spojeva

Probiotici pokazuju antibakterijsko djelovanje protiv patogena i/ili Gram-pozitivnih i Gram-negativnih uzročnika kvarenja hrane proizvodnjom antibakterijskih tvari kao što su bakteriocini, organske kiseline, vodikov peroksid (Arauz i sur., 2009; Razdan i sur., 2012; Bajaj i sur., 2015; Bajaj i sur., 2014; Dec i sur., 2014). Antibakterijske tvari proizvedene pomoću probiotika pokazuju učinke u inhibiranju rasta patogenih bakterija individualno ili sinergistički. Za probiotike se dokazalo da proizvode širok raspon različitih bakteriocina kao što su nisin (Arauz i sur., 2009) koji predstavlja glavni mehanizam njihovog antimikrobnog djelovanja. Laktobacili i bifidobakterije su pokazali inhibitorni učinak na širok raspon patogena, uključujući *Escherichia coli*, *Salmonella* vrste, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* i *Rotavirus* (Bermudez-Brito i sur., 2012). Bakteriocini proizvedeni od Gram-pozitivnih bakterija imaju uzak spektar djelovanja i djeluju samo protiv srodnih bakterija,

međutim neki bakteriocini inhibiraju uzročnike kvarenja hrane poput *Listeria monocytogenes* (Nielsen i sur., 2010).

Pojedini sojevi roda *Bifidobacterium* proizvode jedinstveni bakteriocin, bifidocin B, koji pokazuje aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija. Dva *Bifidobacterium* soja su pokazala snažnu inhibitornu aktivnost prema rastu nekoliko patogenih bakterija, uključujući *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 i *E. coli* C1845 (Bermudez-Brito i sur., 2012). Dvadeset *Lactobacillus* sojeva inhibiraju rast enteropatogene *Yersinia enterocolitica* dok dva soja, *Lactobacillus casei* C1 i *Lactobacillus plantarum* C4 inhibiraju rast bakterija *Salmonella enterica* serovar Typhimurium i *Listeria monocytogenes*, uz *Y. enterocolitica*. Mehanizam inhibicije je smanjenje pH vrijednosti zbog fermentacije dekstroze od strane laktobacila. Međutim, zaštitni učinci ovih probiotičkih sojeva se nisu mogli dokazati na modelima miševa inficiranim bakterijom *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Bujalance i sur., 2014).

Zajednički mehanizmi bakteriocinima posredovane inhibicije uključuje uništavanje ciljnih stanica stvaranjem pora i/ili inhibicijom sinteze stanične stijenke. Na primjer, nisin formira kompleks sa krajnjim prekursorom stanične stijenke, lipidom II, pri čemu inhibira biosintezu stanične stijenke. Posljedično, kompleks agregira i povezuje peptide da formiraju poru u bakterijskoj membrani (Nielsen i sur., 2010; Hassan i sur., 2012).

2.4.2. Blokiranje mjesta za adheziju

Adhezija na sluznicu crijeva je jedan od glavnih svojstava odabira probiotika. Adhezija je potrebna za crijevnu kolonizaciju i također je važna za modulaciju imunološkog sustava i antagonizam protiv patogena. Bakterije mliječne kiseline pokazuju razne površinske determinante koje su uključene u njihovu interakciju sa crijevnim epitelnim stanicama i mukozom koje pomažu kompetitivnu ekskluziju patogena iz mukoze. Nekoliko proteina kod laktobacila (uz šećerne dijelove i lipoteihoničnu kiselinu) potiču adheziju na mukozni sloj (Van Tassell i Miller, 2011; Bermudez-Brito i sur., 2012). Za probiotičke bakterije, poput *L. plantarum* je dokazano da induciraju mucine MUC2 i MUC3 i inhibiraju adheziju enteropatogene *E. coli*. Dakle, poboljšani mukozni slojevi i glikokaliks osiguravaju zaštitu protiv invazije patogena. Probiotički organizmi se vežu na intestinalnu crijevnu epitelnu

površinu te tako blokiraju adhezijska mjesta i sprječavaju kolonizaciju patogenih bakterija (Ohland i MacNaughton, 2010). Prilikom administracije, laktobacili se natječu za vezna mjesta, pri čemu ostavljaju manje dostupnih veznih mjesta za patogene, oni prolaze kroz crijeva i brže napuštaju organizam (Sun i sur., 2007).

Sojevi *Bifidobacterium longum* i *B. catenulatum* koji su otporni na kiseline pokazuju bolju adheziju za humanu intestinalnu mukozu u usporedbi sa sojevima osjetljivima na kiseline (Collado i sur., 2006). Otpornost na kiselinu kod bifidobacteria povećava potencijalnu funkcionalnost poboljšanjem stabilnosti i površinskih svojstava (Caballero-Franco i sur., 2007).

S. aureus koristi integrin $\alpha 5\beta 1$ za vezanje na keratinocite, a blokiranje ovog integrina rezultira protektivnim učinkom slično onom uočenom kod probiotika. Preživljavanje keratinocita je značajno veće ako se probiotici primjenjuju prije ili istovremeno sa infekcijom *S. aureus*. To ukazuje na činjenicu da je protektivni mehanizam *Lactobacillus reuteri* ekskluzija patogena kompeticijom za njegovo vezno mjesto na stanicama. Primjena probiotika može inhibirati kolonizaciju kože sa *S. aureus* i pomoći u prevenciji infekcije (Prince i sur., 2012).

2.4.3. Kompeticija za nutrijente

Kompeticija za hranjive tvari može biti jedan od mehanizama sprečavanja kolonizacije patogena u ljudskim crijevima. Kada su korisne bakterije prisutne u crijevima, one troše više hranjivih tvari te tako ostavljaju manje nutrijenata za patogene bakterije. Prema tome kompetitivna ekskluzija se odvija na dva načina: prvo, konzumiranjem hranjivih tvari i trošenjem izvora energije sprječavaju njihovu proliferaciju i rast patogena u crijevnom okruženju, drugo, svojim metabolizmom i fermentacijom proizvode nekoliko organskih kiselina i hlapljivih masnih kiselina te time smanjenju pH vrijednost u crijevima koji je tada niži od pH potrebnog za rast patogenih bakterija kao što su npr. *E. coli* i *Salmonella* vrste (Bermudez-Brito i sur., 2012). Probiotici se mogu na sličan način natjecati sa patogenima za nutrijente, izazvati njihovu ekskluziju i tako osigurati zaštitu domaćina. Stoga, kompeticija za hranjive tvari između probiotika, crijevnih patogena i mikrobiote može igrati značajnu ulogu.

Željezo predstavlja jedan od esencijanih hranjivih tvari za većinu bakterija i često je dostupan u ograničenim količinama. Međutim, laktobacili ne trebaju željezo za rast što im daje prednost pred bakterijama kojima je željezo esencijalan faktor rasta (patogeni). Neki probiotici kao *L. acidophilus* i *L. delbrueckii* vežu željezov hidroksid na površinu stanice te ga tako čine nedostupnim za patogene mikroorganizme (Elli i sur., 2000). Probiotičke bakterije mijenjaju fizički okoliš na takav način da patogene bakterije ne mogu preživjeti (Woo i Ahn, 2013).

2.4.4. Imunomodulacijski učinci

Identificirani su različiti putevi kojima probiotici moduliraju imunosni sustav (van Hemert i sur., 2013; Hyland i sur., 2014). Jedan od mogućih mehanizama probiotika u zaštiti domaćina od crijevnih bolesti je stimuliranje specifične i nespecifične imunosti. Produkti metabolizma bakterija mliječne kiseline pokazuju imunomodulatornu aktivnost inhibicijom upalnih odgovora, regulacijom ekspresije Toll-like receptora, aktivacijom dendritičkih stanica i NK (eng. Natural killer) stanica u urođenoj imunosti; proliferacijom limfocita, balansiranjem T-helper (Th1/Th2) staničnih odgovora, izlučivanjem IgA, i na još nekoliko drugih načina (Tsai i sur., 2012).

Probiotičke bakterije provode svoje korisne učinke i moduliraju imunološki sustav domaćina protiv potencijalnih štetnih antigena aktivacijom limfocita i proizvodnjom antitijela. Kolonizacija zdravih mikroba dovodi do sazrijevanja humoralnih imunoloških mehanizama, posebice cirkulacije IgA i IgM sekretornih stanica. Nakon sazrijevanja, memorijske B i T stanice migriraju do efektorskih mjesta uz aktivnu proliferaciju, lokalnu indukciju određenih citokina i proizvodnju sekretornih antitijela IgA. Ulazak probiotika u crijeva stimulira proizvodnju IgA. Proizvodnja IgA u imunološkom sustavu postaje jasna iz studija provedenim na miševima, koje su održani „germ-free“ nakon rođenja (Ng i sur., 2009). Mnoga istraživanja su pokazala da su BMK kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i njihovi fermentirani proizvodi, učinkoviti u poboljšanju urođenog i adaptivnog imuniteta, sprječavanju razvoja mukoznih lezija u želucu, ublažavanju alergija i obrani protiv crijevnih patogenih infekcija (Tsai i sur., 2012).

Laktobacili također stimuliraju imunološke stanice na oslobađanje protuupalnih citokina kao što su faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ) i interleukin-12 (IL-12). Mehanizmi urođene imunosti uključuju poboljšanje prezentacije antigena, fagocitozu na antigen prezentirajućim stanicama (APCs) i citotoksičnost NK stanica, od kojih svi mogu ubiti transformirane stanice na naizgled nespecifičan način. Dendritičke stanice igraju ključnu imunoregulatornu ulogu u imunološkom odgovoru kod unosa i obrade antigena, kao što su indukcija antigen specifičnog imunološkog odgovora i Th1/Th2 ravnoteža. Probiotici reguliraju izlučene citokine sa dendritičkim stanicama kako bi se poboljšao morbiditet crijevnih bolesti (Tsai i sur., 2012). Interakcija između CD40 i CD154 na dendritičkim stanicama i CD4⁺ T stanicama, inducira sazrijevanje i ekspanziju CD4⁺ T stanica, što posljedično dovodi do aktivacije, proliferacije, i diferencijacije (Grewal i Flavell, 1998). Nadopuna prehrane sa probioticima može modulirati i urođeni i adaptivni imunološki odgovor lokalno i sistematski. Povećanje regulacije aktivacije pomoćničkih T stanica inducira jaču DC/NK i DC/CD4⁺ T interakciju stanica, proliferaciju limfocita, i ekspresiju citokina (Tsai i sur., 2012).

2.4.5. Degradacija receptora toksina

Probiotici modificiraju receptore toksina pomoću enzimskog mehanizma. Tako na primjer degradacija receptora toksina na crijevnoj mukози *Saccharomyces boulardii* štiti domaćina od crijevne bolesti uzrokovane *Clostridium difficile*. Neki drugi mehanizmi su supresija proizvodnje toksina, redukcija crijevnog pH, atenuacija virulencije (Bermudez-Brito i sur., 2012). Probiotici također mogu modificirati receptore toksina i blokirati toksin-posredovanu patologiju. Probiotici mogu također poticati nespecifičnu stimulaciju imunskog sustava domaćina, uključujući proliferaciju imunoloških stanica, poboljšanje fagocitozne aktivnosti makrofaga, i povećanje proizvodnje sekretornog imunoglobulina IgA i IgM (Kaur i sur., 2009).

2.4.6. Antiproliferirajući učinci

Za probiotike se tvrdilo da imaju anti-tumorsku aktivnost koja se može pripisati smanjenoj prisutnosti bakterija truljenja kao što su *Clostridium* vrste, koliformne bakterije ili *Bacteroides* vrste te povećanoj razini laktobacila i bifidobakterija koje pomažu smanjenoj

pojavi raka debelog crijeva (O'Shea i sur., 2012). Tretman sa probioticima koji mogu ublažiti kronične upale u crijevima također mogu biti korisne u prevenciji karcinoma debelog crijeva, zbog toga što kronična upala potiče pojavu ove bolesti. Primjer protuupalno aktivnog probiotika je *Streptococcus thermophilus* TH-4, koji proizvodi velike količine folata (folne kiseline) važnih za popravak DNA u stanicama epitela (Van Guelpen i sur., 2006; Tooley i sur., 2006). Značajna anti-mutagena aktivnost mnogih laktobacila i nekih sojeva bifidobaterija može biti posljedica njihove sposobnosti da metabolički inaktiviraju mutagene tvari. Određeni probiotici vežu N-nitrozo spojeve i heterocikličke aromatske amine. To može dovesti do reduciranja razina kancerogenih spojeva i do reduciranja oštećenja DNA (Geier i sur., 2006).

Još jedan mehanizam antitumorskog djelovanja probiotika može biti njihova sposobnost da pojačavaju imunološki odgovor na tumorsko tkivo modulacijom proizvodnje citokina i funkcijom T stanica (Hirayama i Rafter, 2000). *Lactobacillus* i *Lactococcus* sojevi izolirani iz prehrambenih proizvoda se mogu smatrati probioticima zbog njihovih karakteristika da pospješuju zdravlje domaćina uključujući antikancerogenu aktivnost (Haghshenas i sur., 2014).

2.4.7. Modulacija crijevne mikrobiote

Crijevna mikrobiota je uključena u reguliranje nekoliko fizioloških funkcija, od regulacije energije i kognitivnih procesa do neutralizacije toksina i imuniteta protiv patogena. Razvoj i početak različitih kroničnih bolesti se javlja ako dođe do promjene u crijevnoj mikrobioti. Studije su pokazale da crijevna mikrobiota igra ključnu ulogu u razvoju raznih stanja bolesti, uključujući pretilost, bolest masne jetre i plućne infekcije. Intervencije sa mogućom primjenom prebiotika i probiotika pomažu u održavanju optimalnog zdravlja crijeva, i prevenciji/liječenju kroničnih upalnih i imunološki povezanih bolesti (Lin i sur., 2014). Potencijalne zdravstvene prednosti probiotika mogu biti posljedica direktnog učinka probiotičkih stanica pomoću izlučenih staničnih komponenata, metaboličkih učinaka i staničnih interakcija. Probiotičke bakterije dolaze do debelog crijeva u količini koja ovisi o njihovom preživljavanju u želucu i tankom crijevu. Utjecaj probiotika na okoliš debelog crijeva se prvenstveno pripisuje fekalnoj otpornosti primjenjenih sojeva. Oni postepeno koloniziraju crijeva i nestaju nakon što prestane njihovo unošenje. Modulacija komensalne mikrobiote sa tranzitnim probioticima je posljedica djelovanja antimikrobnih spojeva sa širokim spektrom djelovanja kao što su reuterin ili plantaricin ili modulacije imunološkog

sustava ili funkcije barijere crijevnog epitela. Probiotici se koriste u prevenciji dijareje koja je inducirana upotrebom antibiotika, u prevenciji akutne infektivne dijareje, a pomažu i kod drugih povezanih bolesti kao što je sindrom iritabilnog crijeva. Korištenjem probiotika sastav crijevne mikrobne zajednice ostaje dulje stabilan, što je u pozitivnoj korelaciji sa poboljšanjem simptoma bolesti (Ceapa i sur., 2013). Većina dostupnih dokaza o utjecaju probiotika na sastav i funkciju mikrobiote je dobivena primjenom specifičnih bakterijskih rodova kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* dok ova vrsta prehrane može također imati vrlo suptilan utjecaj na druge važne rodove (Rautava i sur., 2012).

Mikrobna neravnoteža u imunološki povezanim bolestima kao što su alergije ili IBS se može ponovno uspostaviti primjenom probiotika što može biti povezano represijom specifičnih patogena ili stimulacijom endogeno korisnih skupina direktnim molekularnim interakcijama sa imunosnim stanicama u tankom crijevu. Od tranzitnih probiotika se stoga ne očekuje da utječu na globalnu strukturu crijevne mikrobiote na značajan način, nego da direktno moduliraju imunološki sustav i raznovrsnim epitelnim receptorima duž cijelog probavnog trakta.

Uzevši u obzir sve zajedno, probiotički sojevi koji mogu kombinirati specifične i direktne interakcije sa domaćinom sa tranzijentnim utjecajem na boravišnu mikrobiotu mogu izazvati višeznačajni pozitivni učinak na zdravlje (Bajaj i sur., 2014; Ceapa i sur., 2013; Lin i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu u *in vitro* eksperimentima korištena su tri soja bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* prikazana u Tablici 1. Soj čija su svojstva ispitivana je *L. brevis* ZG1. Kao pozitivna kontrola korišten je soj *L. helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, a kao negativna kontrola korišten je soj *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine. Navedeni sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Sojevi se čuvaju pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola.

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u ovom diplomskom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	ZG1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, 37 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

Za održavanje, čuvanje i uzgoj korištene su optimalne hranjive podloge za bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) kruta hranjiva podloga sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; kvašćev ekstrakt 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; MgSO₄·7 H₂O 0,05 g/L; MnSO₄·7 H₂O 0,05 g/L; natrijev-acetat 5,0 g/L; agar 20,0 g/L, u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- MRS bujon je jednakog sastava kao MRS agar, samo bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

U ovom eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- agaroz, „Appligane“, Strasbourg, Francuska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- APS, „Kemika“, Hrvatska
- citratna kiselina, „Sigma“, SAD
- Dcode dye solution, „Biorad“, SAD
- dNTP mix, 10 mM, „Promega“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim, Njemačka
- fiziološka otopina
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- Gene Ruler DNA standard, „Fermentas“, Kanada
- GoTaq® Flexi Buffer, „Promega“, SAD
- GoTaq® Flexi DNA Polymerase, „Promega“, SAD
- goveda žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- gvanidin hidroklorid (GHCl), „AppliChem GmbH“, Njemačka
- HDA1 i HDA2 specifične početnice
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- karbonatni i bikarbonatni pufer
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- kristal-violet, „Kemika“, Hrvatska
- LiCl, „Aplichen“, Njemačka
- magnezijev klorid, 25 mM, „Promega“, SAD
- mucin, „Sigma“, SAD
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Nuclease Free Water „Ambion“, SAD
- obrano mlijeko u prahu, „Fluka“, Njemačka
- reducirajući reagens
- standard za elektroforezu proteina (molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- TEMED, „Sigma“, SAD
- Tween 20, „Sigma“, SAD

- λ HindIII DNA standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.4. Aparatura i pribor

U ovom eksperimentalnom radu korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- DGGE system, „BioRad“, SAD
- elektroforetske kadice, „Cleaver Scientific Ltd“, Velika Britanija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrotitarske pločice s 96 jažica
- PCR uređaj, „Applied Biosystems“, SAD
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Probiotički sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta probiotički sojevi su inokulirani u svježu optimalnu hranjivu podogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 1.

3.2.2. Gel elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Koncentracija DNA se mjeri pomoću BioSpec Nano uređaja, pri čemu se kao sijepa proba koristi TE pufer. Zatim se provodi PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) za DGGE s HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') početnicama. Kao negativna kontrola da fragment dobiven na gelu nije dimer početnica koristi se uzorak koji ne sadrži DNA.

Nakon toga se provodi DNA elektroforeza dobivenih PCR produkata na agaroznom gelu u 1x TAE puferu. Kao standard se koristi 0,5 µL Gene Rulera (100 bp Ladder) i 0,25 µL λ HindIII. DNA elektroforeza se provodi pri 200 V i 80 mA kroz 30 min u kadici za elektroforezu. Nakon završene elektroforeze gel se boja sa otopinom etidijevog bromida koncentracije 0,5 µg/mL kroz 10 min. Gel se zatim prebaci na UV transiluminator te se pomoću programa Gel Capture snimi slika gela pri valnoj duljini od 254 nm.

Prikaz aparature za pripravu gela za DGGE je prikazan na Slici 4. Gel za DGGE se priprema tako da se pomiješaju reagensi prema proračunu za različite gradijente kako je prikazano u Tablici 2. Ukupni volumen 100%-tne i 0%-tne otopine se izračuna zbrajanjem potrebnog volumena tih otopina prema željenom gradijentu (postotku) zaokruženom na prvi cijeli broj, čiji rezultati su prikazani u Tablici 3. Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju se doda 130µL APS-a (stock 0,1g/mL) i 5,8 µL TEMED-a. U suspenziju gela višeg postotka dodaje se plava boja Dcode dye solution (100µL na 5mL - 300 µL) kako bi se te dvije suspenzije razlikovale. Kao uzorci se koriste PCR produkti svakog soja, a kao standard se koriste pomiješani sojevi jer DGGE nema komercijalne standarde. Nanošenje

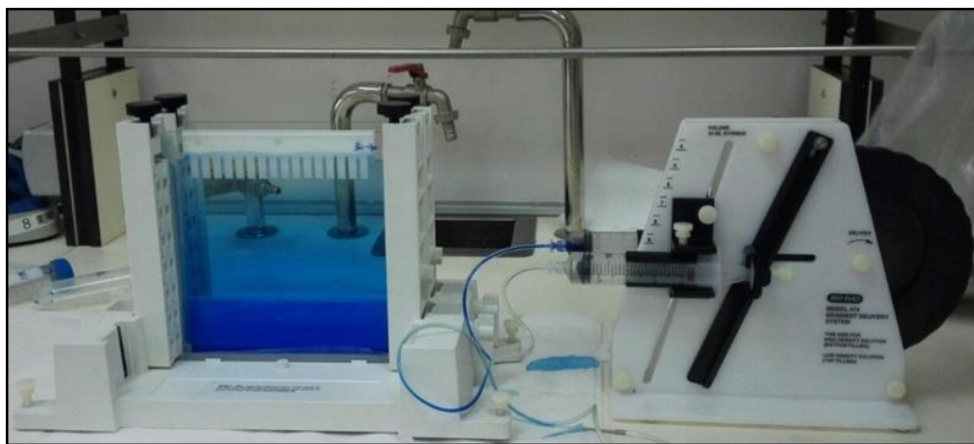
uzoraka započinje kod postignutih 58 °C, a sama elektroforeza započinje kod postignutih 60 °C. Nakon elektroforeze provodi se bojanje gela u etidijevom bromidu i skeniranje. DGGE elektroforeza se provodi pri 220 V kroz 3 sata, a završetkom elektroforeze gel se tretira na isti način kao kod DNA elektroforeze.

Tablica 2. Prikaz proračuna reagenasa potrebnih za dobivanje 100%-tnih i 0%-tnih otopina volumena 34 mL za dobivanje gela za DGGE

PRIPREMA GELA ZA DGGE (volumena 34 mL)				
REAGENS	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	100 %	0 %
Urea		7 M	7,14 g	/
Formamid		40 %	6,8 mL	/
TAE	50x	1x	340 µL	34 µL
Akriamid/bisakrilamid	40 %	8 %	3,4 mL	3,4 mL
Voda			Nadopuniti do ukupnog volumena	
UKUPNI VOLUMEN			17 mL	17 mL

Tablica 3. Prikaz potrebnih volumena 100%-tne i 0%-tne otopine za dobivanje željenog gradijenta gela 1 (30 % i 70 %) i gela 2 (40 % i 60 %)

Volumen 100 %	Volumen 0 %	%	Ukupni volumen	Broj gela
3,4	13,6	20	17	
5,1	11,9	30	17	Gel 1
6,8	10,2	40	17	Gel 2
8,5	8,5	50	17	
10,2	6,8	60	17	Gel 2
11,9	5,1	70	17	Gel 1



Slika 4. Prikaz aparature za pripravu gela za DGGE

3.2.3. Ekstrakcija proteina vezanih na S-sloj (eng. Surface-layer associated proteins, SLAP) pomoću LiCl

Ekstrakcija SLAP proteina modificirana je prema standardnoj LiCl S-sloj ekstrakcijskom protokolu za *L. acidophilus* (Goh i sur., 2009; Lortal i sur., 1992). Prekonoćne kulture stanica se centrifugiraju 10 minuta pri 2,236 x g (rcf) i 4 °C. Talog stanica se ispire 2 puta s hladnim fosfatnim puferom pH=7,4. Dodaje se 10 mL 5 M litijevog klorida (LiCl) s ciljem odvajanja S-proteina i SLAP proteina od stanica, i 30 min se drže na 4 °C uz povremeno protresanje. Centrifugira se 10 minuta pri 8,994 x g (rcf) i 4 °C. Supernatanti svakog soja se prebace u Spectra/Por poroznu membranu (Slika 5) i dijaliziraju se u hladnoj destiliranoj vodi na magnetskoj mješalici 24 h, mijenjajući prvih 8 h vodu svaka 2 h.

Sadržaj svake membrane nakon dijalize se centrifugira na sobnoj temperaturi 30 min pri 20,000 x g (rcf). Talog se resuspendira u 1 mL 1 M LiCl pri 4 °C i 15 minuta kako bi se razdvojili SLAP proteini od S-proteina koji nisu topljivi u 1 M LiCl. Suspenzija se centrifugira 10 minuta pri 20,000 x g. Supernatanti se prebace u Spectra/Por membranu i provodi se ponovna dijaliza. Sadržaj membrane nakon druge dijalize se centrifugira 30 minuta pri 20,000 x g (rcf). Talog se resuspendira u 10 µL reducirajućeg reagensa i prokuha 10 min pri 80 °C. Na gel za SDS-PAGE se pomoću Hamiltonove igle stavlja 5 µL svakog uzorka, 5 µL standarda i 3 µL reducirajućeg reagensa.

Na gel se nanose i uzorci nakon prve dijalize kako bi se provjerila učinkovitost provedene metode. Dio sadržaja membrane nakon prve dijalize se centrifugira pri 20 000 o/min 30 min. Pomiješa se 15 µL supernatanta s 5 µL reducirajućeg reagensa, a talog se

resuspendira s 10 μ L reducirajućeg reagensa. Uzorci se prokuhaju 10 min na 80 °C i nanose na gel, također Hamiltonovom iglom.



Slika 5. Prikaz pripremljenih ispitivanih uzoraka prije dijalize koji se nalaze u Spectra/Por poroznoj membrani pričvršćeni na krajevima vezicom

3.2.4. Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima

Prati se rast prekonoćnih kultura BMK u mikrotitarskim pločicama pri različitim temperaturama (30 °C, 37 °C i 45 °C), sniženom pH (pH=3) koji je podešen 1M HCl-om, uz dodatak određene količine soli (4,5 % i 6,5 % NaCl), te uz dodatak žučnih soli (0,5 %, 1 % i 1,5 %). 15 μ L prekonoćnih kultura odabranih izolata se nanose na 4 mikrotitarske pločice pri čemu se na dvije prati rast u svim pripremljenim medijima u 3 paralele te se one inkubiraju pri 37 °C, na trećoj se prati rast BMK u čistoj MRS podlozi pri 30 °C, a na četvrtoj se prati rast BMK u čistoj MRS podlozi pri 45 °C. Slijepu probu čini čisti MRS medij. Nakon nanošenja uzoraka, određuje se početna apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm i pločice se inkubiraju pri određenim temperaturama. Mjerenje apsorbancije se provodi svaka 2 sata prvih 6 sati te na kraju procesa, odnosno 22. i 24. sat. Nakon 24 sata izračunavaju se srednje vrijednosti i standardna devijacija te se određuje rast svakog ispitivanog soja ovisno o datim uvjetima.

3.2.5. Analiza proteolitičke aktivnosti

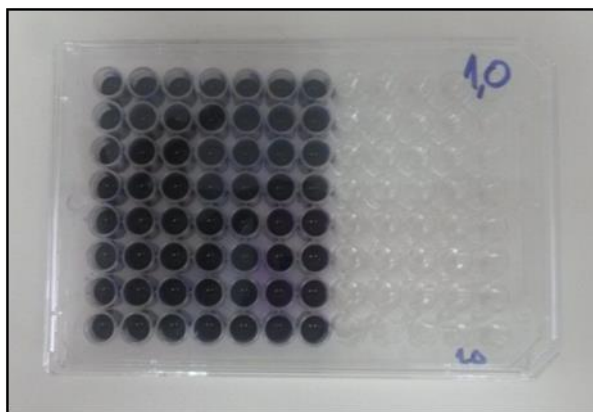
Prekonoćne kulture stanica se resuspendiraju u 5 mL otopine obranog mlijeka (2%). Kao kontrola se koristi 5 mL same otopine obranog mlijeka. Provodi se inkubacija preko noći pri 37 °C. Prebaci se 1 mL bistre suspenzije i centrifugira se 5 min pri 10 000 o/min. Nakon toga supernatant se pomiješa sa reducirajućim reagensom (omjer 15:5) koji sadrži SDS za denaturaciju proteina. Uzorci se zagrijavaju 10 min pri 80 °C. Pomoću Hamiltonove igle se na gel za SDS-PAGE (eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) nanose uzorci. Kao standard se dodaju proteini niske molekulske mase zajedno sa reducirajućim reagensom.

SDS-PAGE (4% gel za sabijanje i 12% gel za razdvajanje) se provodi pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min u kadici za elektroforezu. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u 0,1%-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50% metanola i 7% octene kiseline kroz najmanje 3 sata. Nakon bojanja, gel se odbojava u 7%-tnoj octenoj kiselini nakon čega se gelovi skeniraju (Scanjet 3800; Hewlett Packard, CA, SAD).

3.2.6. Adhezija na mucin

Adhezija probiotičkih sojeva navedenih u Tablici 1. na mucin u *in vitro* uvjetima provedena je na mikrititarskoj pločici sa 96 jažica (Slika 6). Mikrotitarsku pločicu je prethodno pripremljena na način da se jažice tretiraju otopinom mucina koncentracije 10 mg/mL u karbonat/bikarbonatnom puferu (50 mmol/L, pH 9,6) te inkubiraju preko noći pri 4 °C. Jažice se ispiru tri puta sa fosfatnim puferom i nakon toga se dodaje po 100 µL fosfatnog pufera (PBS) sa 1% Tween 20 i inkubira se 1 sat pri sobnoj temperaturi kako bi se mucin imobilizirao. Iz jažica se pažljivo izvadi PBS sa Tweenom i nakon toga u svaku jažicu se dodaje po 100 µL prethodno pripremljene suspenzije sojeva u tri paralele. Izrasle kulture sojeva navedenih u Tablici 1. se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, a apsorbancija im je podešena tako da se dobiju uzorci koncentracije $A_{620} = 0,5$ za svaki od ispitivanih sojeva. Stanice se resuspendiraju u 4 mL fiziološke otopine, odnosno u otopini 5 M gvanidin hidroklorida ($M=95,53$ g/mol) za skidanje S-proteina. Osim u jažice sa mucinom, suspenzije sojeva se također dodaju u jažice bez mucina što služi kao kontrola adhezije. U slijepu probu umjesto stanica se dodaje fosfatni pufer. Tako pripremljene pločice se inkubiraju preko noći pri 37 °C.

Neadhezirane stanice se uklanjaju uzastopnim ispiranjem sa 0,05 % Tween 20 u fosfatnom puferu. Adhezirane stanice se detektiraju dodatkom kristal violeta u svaku jažicu, ispiranjem tri puta sa fosfatnim puferom i dodavanjem citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4,0). Mjeri se apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm, izračunava se srednja vrijednost i standardna devijacija.



Slika 6. Prikaz mikrotitarske pločice sa 96 jažica u kojoj je provedeno ispitivanje adhezije probiotičkih sojeva na mucin

4. REZULTATI I RASPRAVA

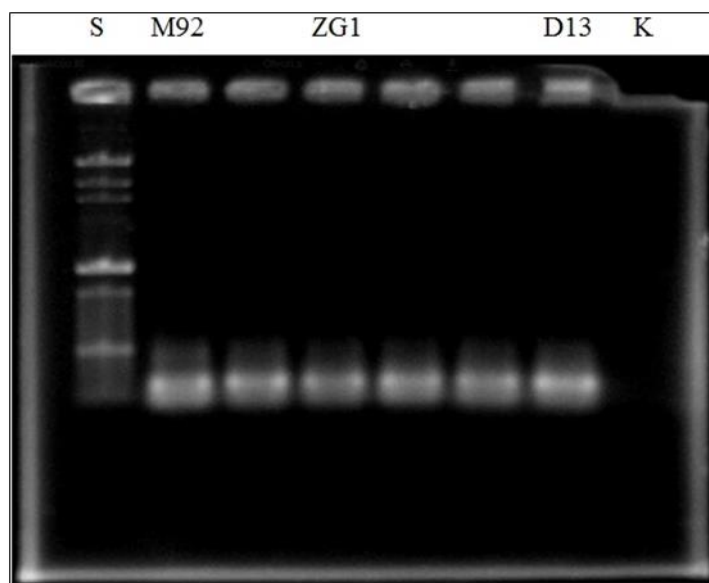
4.1. USPOREDBA ISPITIVANIH *Lactobacillus* SOJEVA PRIMJENOM GEL ELEKTROFOREZE U DENATURIRAJUĆEM GRADIJENTU (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Uspoređeno je 6 bakterijskih sojeva korištenih u ovom eksperimentu, koja pripadaju rodu *Lactobacillus*. Primjenom gel elektroforeze u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) moguće je razlikovati bakterijske vrste unutar istog bakterijskog roda. Stoga je najprije provedena izolacija DNA ispitivanih bakterijskih sojeva.

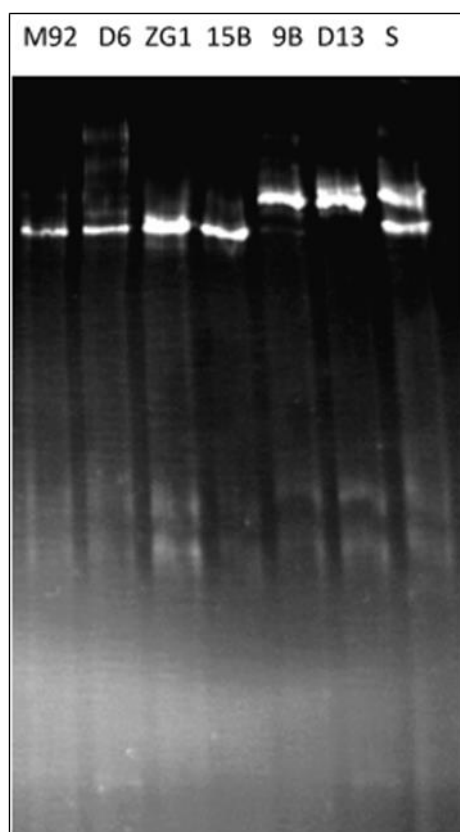
Mjerenjem koncentracije DNA sa BioSpec Nano uređajem dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 4. Zatim je proveden PCR za DGGE s HDA1 i HDA2 početnicama u svrhu umnažanja fragmenata koje omeđuju ove dvije početnice i vizualizacija DNA vrpce na gelu. Kako bi se ispitala uspješnost provedene PCR reakcije provedena je DNA elektroforeza sa dobivenim produktima PCR reakcije. Kao negativna kontrola, da fragment dobiven na gelu nije dimer početnica, korišten je uzorak koji ne sadrži DNA. Gel je obojan otopinom etidijevog bromida i skeniran, a rezultati su prikazani na Slici 7. Nakon toga je provedena DGGE elektroforeza sa dva gela koja imaju različite gradijente (30 do 70 %; 40 do 60 %) pri čemu je kao standard korištena DNA svih ispitivanih sojeva BMK. Gel se također boja u etidijevom bromidu i skenira.

Tablica 4. Prikaz rezultata mjerenja koncentracije DNA BioSpec Nano uređajem

Uzorak	Koncentracija (ng/ μ L)
<i>Lactobacillus helveticus</i> M92	75,53
<i>Lactobacillus brevis</i> ZG1	215,29
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13	556,53



Slika 7. Prikaz gela nakon provedene DNA elektroforeze sa produktima PCR reakcije primjenom HDA1 i HDA2 početnica; S - standard; M92 - *Lactobacillus helveticus*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K - negativna kontrola



Slika 8. Usporedba PCR produkata dobivenih primjenom HDA1 i HDA2 početnica nakon provedene DGGE; S - standard; M92 - *Lactobacillus helveticus*; D6 - *Lactobacillus brevis*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; SF9B - *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*

Rezultati gel elektroforeze su potvrdili da je PCR reakcija uspješno provedena jer su vidljive vrpce kod svih analiziranih sojeva. Negativnom kontrolom je utvrđeno da ne dolazi do dimerizacije početnica HDA1 i HDA2 jer u zadnju jažicu gdje nije stavljen uzorak DNA nema vidljive vrpce DNA (Slika 7).

Provođenjem DGGE pri čemu su umnoženi dijelovi DNA analiziranih sojeva denaturirani i razdvojeni prema molekulskoj masi, provedena je elektroforeza 2 gela koji sadrže različite gradijente denaturirajućeg agensa, a prikazani su rezultati na 30% do 70%-tnom gelu zbog bolje uspješnosti provedene metode (Slika 8). DGGE metodom se mogu razlikovati vrste i iz toga razloga su radi mogućnosti uspoređivanja rezultata uzeti dodatni sojevi za analizu (D6 - *L. brevis*; SF15B - *L. brevis*; SF9B - *L. paraplantarum*). Iz Slike 8 se vidi da na istom mjestu imaju vrpce sve *L. brevis* vrste (sojevi D6, SF15B, ZG1), dok na drugom mjestu imaju sve *L. (para)plantarum* vrste (D13 i SF9B) koji su jako srodne. Soj *L. helveticus* M92 ima tu regiju sličniju *L. brevis* vrstama. Standard čine DNA uzorci svih sojeva i zato su vidljive dvije DNA vrpce.

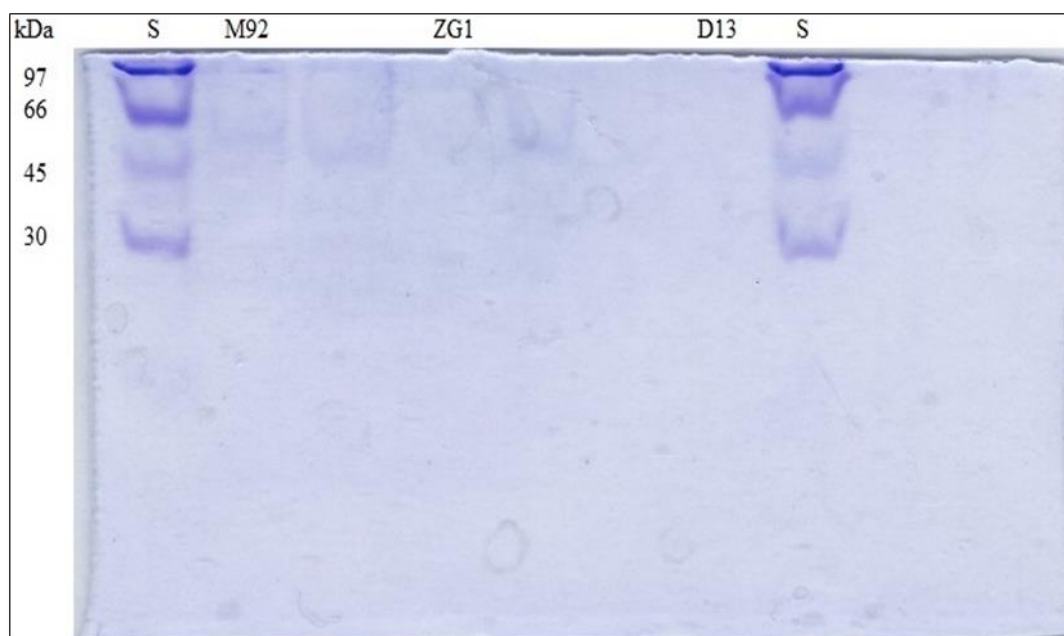
4.2. EKSTRAKCIJA PROTEINA VEZANIH NA S-SLOJ (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP)

S-proteini imaju molekulsku masu u rasponu od 40-200 kDa (Sára i Sleytr, 2000), no usporedbom sa S-proteinima ostalih Gram-pozitivnih bakterija, oni na površini bakterija iz roda *Lactobacillus* su jedinstveni, zbog toga što ne posjeduju SLH (eng. S-layer homologous) domenu (Boot i Pouwels, 1996), najmanji su od svih poznatih S-proteina (25-71 kDa) i imaju visoku pI vrijednost od 9.35 do 10.4 (Åvall-Jääskelläinen i Palva, 2005).

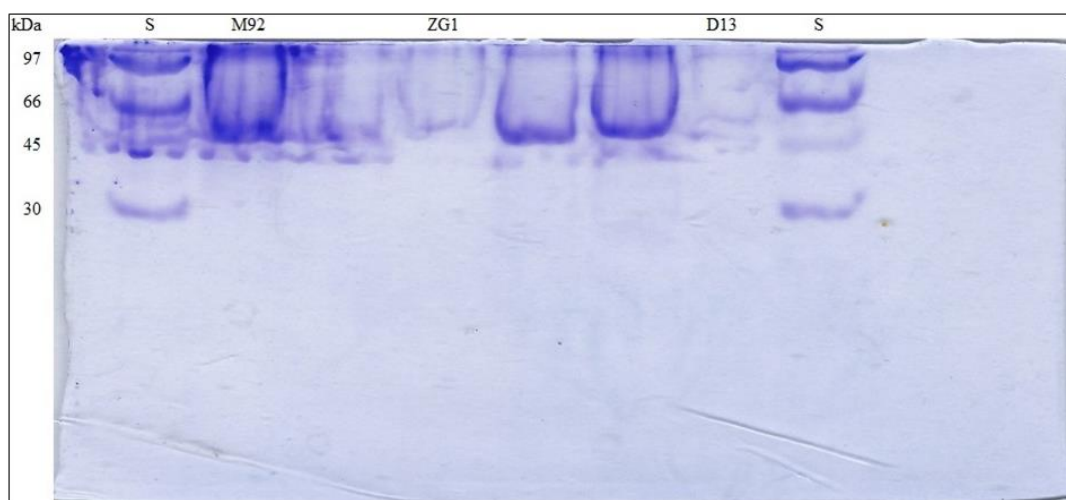
Protokol za ekstrakciju SLAP-a je modificiran prema standardnom ekstrakcijskom protokolu za S-proteine za soj *Lactobacillus acidophilus* (Goh i sur., 2009; Lortal i sur., 1992).

U cilju ekstrahiranja S-proteina i proteina koji su na njih vezani (SLAP) korišten je 5 M LiCl koji je manje letalan za stanice od gvanidin hidroklorida (Ashida i sur., 2011; Beganović i sur., 2011.; Goh i sur., 2009; Lortal i sur., 1992; Smit i sur., 2001; Taverniti i sur., 2013). Stanice su tretirane 5 M LiCl kako bi se ekstrahirali svi S-proteini i proteini koji su na njih vezani (SLAP), nakon čega se provodi dijaliza supernatanta u kojem se nalaze S-proteini i SLAP proteini. Nakon prve dijalize provedena je SDS-PAGE supernatanta (Slika 9) i taloga (Slika 10) kako bi se provjerila učinkovitost metode.

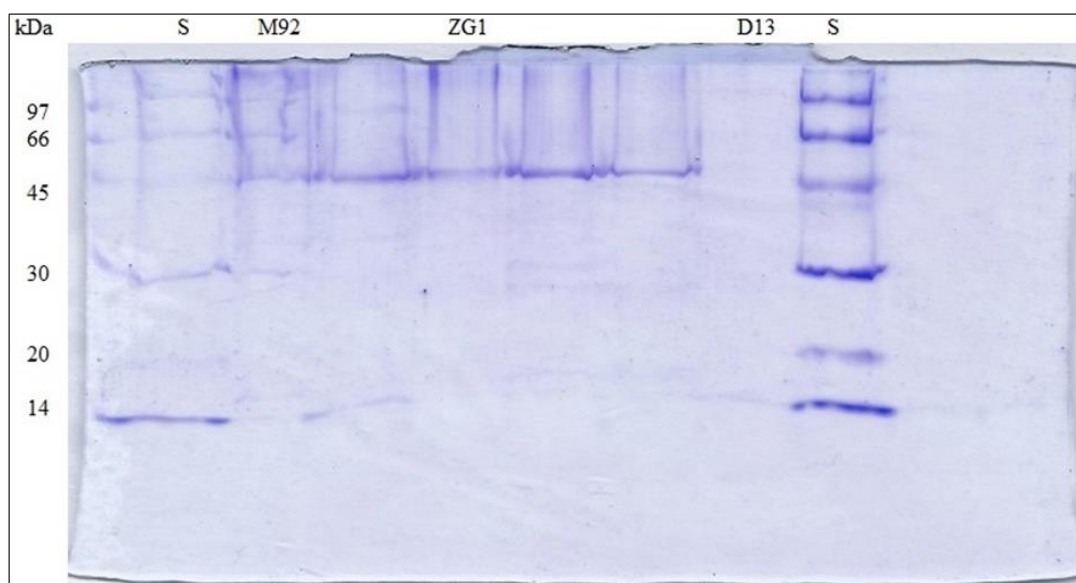
Nakon toga preostali dio je tretiran s 1 M LiCl kako bi se odvojili S-proteini koji nisu topljivi u 1 M LiCl od SLAP proteina koju su na njih vezani, a topljivi su u 1 M LiCl. Nakon druge dijalize je ponovno provedena SDS-PAGE (Slika 11) u cilju provjere prisutnosti SLAP proteina.



Slika 9. Ispitivanje prisutnosti S-proteina i SLAP proteina nakon prve dijalize provođenjem SDS-PAGE elektroforeze supernatanta uzorka proteina nakon tretmana s 5 M LiCl; S - standard; M92 - *L. helveticus*; ZG1 - *L. brevis*; D13 - *L. plantarum*



Slika 10. Ispitivanje prisutnosti S-proteina i SLAP proteina nakon prve dijalize provođenjem SDS-PAGE elektroforeze taloga uzorka proteina nakon tretmana s 5 M LiCl; S - standard; M92 - *L. helveticus*; ZG1 - *L. brevis*; D13 - *L. plantarum*



Slika 11. Ispitivanje prisutnosti SLAP proteina nakon druge dijalize provođenjem SDS-PAGE elektroforeze supernatanta uzorka proteina nakon tretmana s 1 M LiCl; S - standard; M92 - *L. helveticus*; ZG1 - *L. brevis*; D13 - *L. plantarum*.

Nakon provedene prve dijalize, talog i supernatant se nanose na gel za SDS-PAGE u cilju provjere uspješnosti provođenja metode. Rezultati pokazuju da na gelu na koji je nanešen supernatant (Slika 9) nema proteinskih vrpce što je dokaz da u supernatantu nema proteina. Na gelu na koji je nanešen reseuspendirani talog proteina (Slika 10) se vide proteinske vrpce kod soja *L. helveticus* M92 i *L. brevis* ZG1, pogotovo soja *L. helveticus* M92 koji je služio kao pozitivna kontrola jer sadrži gene čijom ekspresijom nastaju S-proteini. Ovi rezultati upućuju na to da je metoda uspješno provedena, odnosno da je uspješno provedeno taloženje S-proteina zajedno sa SLAP proteinima. Također na Slici 10, u usporedbi sa standardom, se vide proteinske vrpce sojeva M92 i ZG1 u rasponu od 45-97 kDa što daje pozitivnu indicaciju da se ovdje radi o S-proteinima jer je njihova molekulska masa od 25-71 kDa.

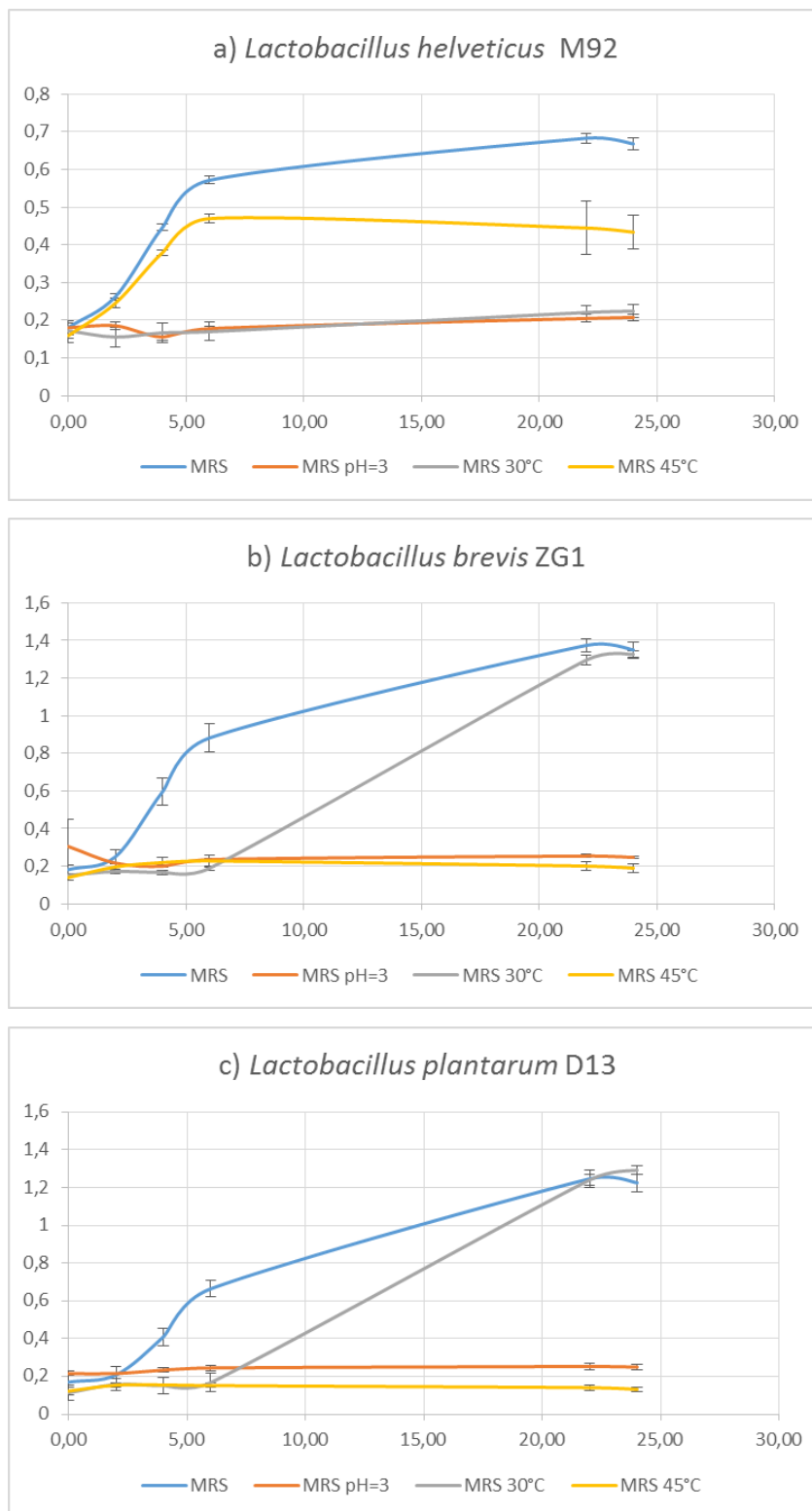
Na Slici 11 koja prikazuje gel nakon druge dijalize se vidi prisutnost jedne vrpce koja odgovara molekulskoj masi S-proteina što upućuje na prisutnost SLAP proteina kod soja *L. helveticus* M92 i kod soja *L. brevis* ZG1. Za soj *L. plantarum* D13 nema vidljive proteinske vrpce što također potvrđuje da taj soj nema S-proteine, a niti SLAP proteine.

4.3. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE BRZINE RASTA ISPITIVANIH *Lactobacillus* SOJEVA U RAZLIČITIM STRESNIM UVJETIMA

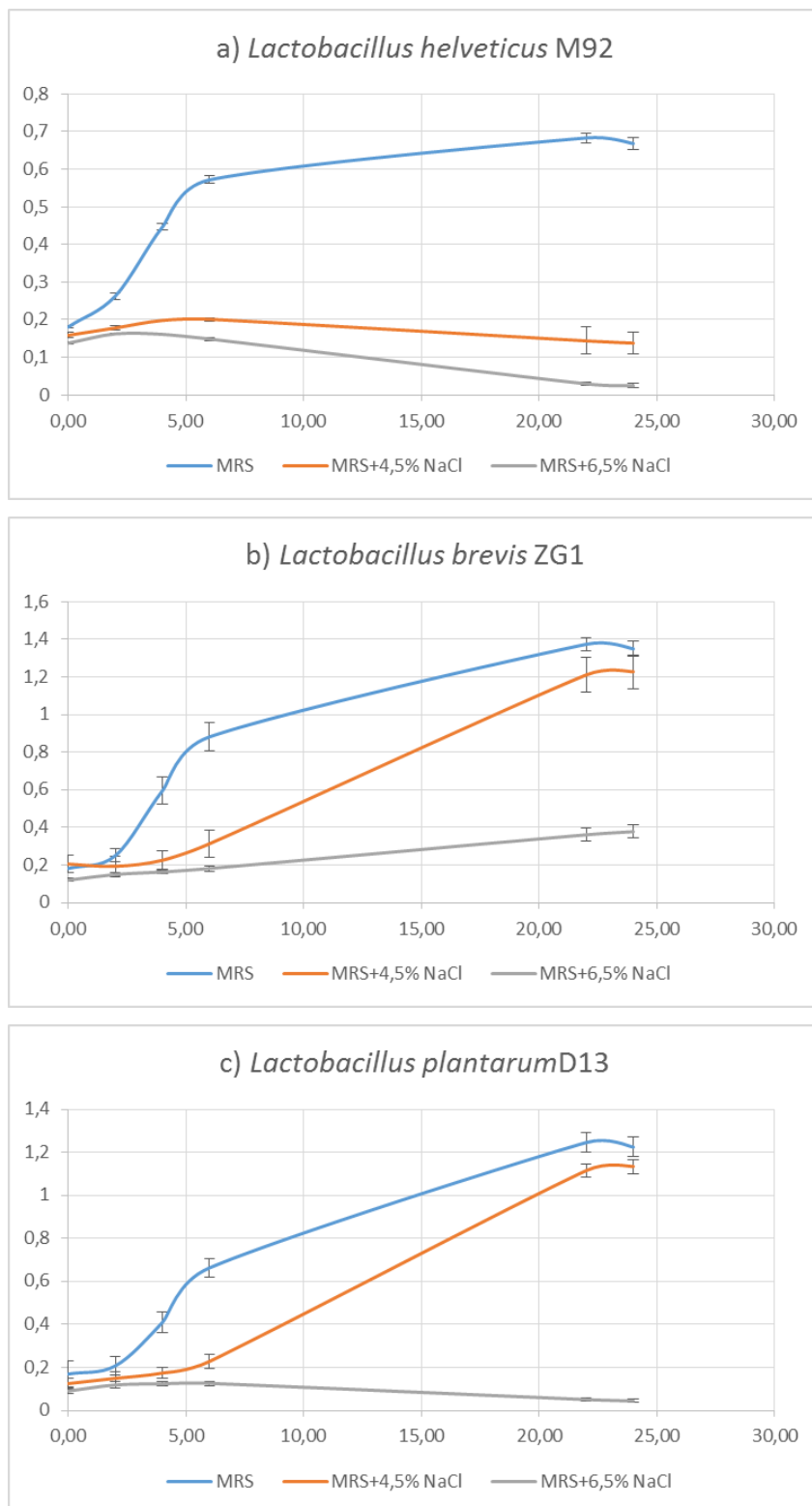
Gastrointestinalni sustav je okoliš pun stresnih uvjeta za bakterije, uključujući nizak pH, prisutnost proteolitičkih enzima, probavnih sokova itd., pri čemu S-proteini imaju protektivnu ulogu kada su mikroorganizmi koji ih sadržavaju izloženi ovakvim gastrointestinalnim uvjetima (Frece i sur., 2005).

Ispitan je rast soja *L. brevis* ZG1 koji eksprimira S-proteine, *L. helveticus* M92 kao pozitivne kontrole za S-proteine i *L. plantarum* D13 kao negativne kontrole, pri različitim temperaturama, sniženom pH, uz dodatak određene količine NaCl i uz dodatak određene količine žučnih soli. U obzir su uzeti upravo ovi uvjeti iz razloga što glavnu prepreku prilikom oralne primjene probiotika čine niska pH vrijednost u želucu i velika koncentracija žučnih soli u tankom crijevu koje inhibiraju rast mnogih Gram-pozitivnih bakterija. Također bakterije mliječne kiseline se nalaze u mnogim fermentiranim proizvodima (sirevi, kiselo zelje) gdje je povišena koncentracija soli, odnosno NaCl, a s obzirom da sojevi korišteni u ovom radu su autohtoni sojevi izolirani iz sira, ispitana je sposobnost njihovog rasta i u ovim uvjetima.

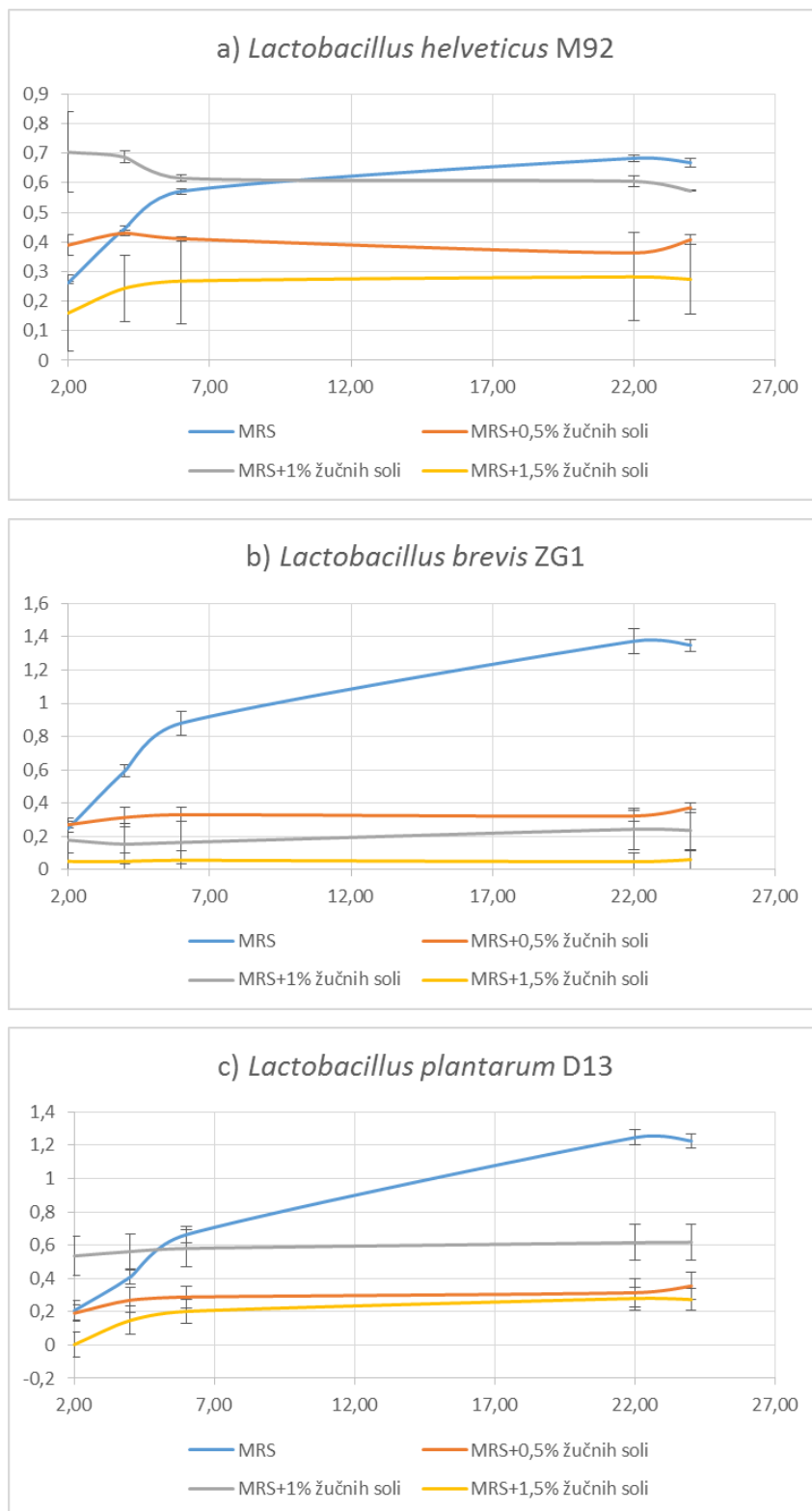
Sojevi su naciepljeni na MRS podlogu i uzgajani pri 30 °C, 45 °C i na sve pripremljene MRS podloge sa žučnim solima, NaCl i sniženom pH vrijednosti na pH=3 u tri paralele pri 37 °C. Kao slijepa proba koriste se sojevi naciepljeni na MRS medij bez dodataka. Nakon nanošenja uzoraka mjeri se početna apsorbancija, a mjerenja se provode svaka 2 sata prvih 6 sati jer su tada stanice u eksponencijalnoj fazi rasta. Zadnja mjerenja se provode 22. i 24. sata jer se tada stanice nalaze u stacionarnoj fazi rasta. Na kraju eksperimenta izračunaju se srednje vrijednosti i standardna devijacija i na osnovu dobivenih rezultata nacrtaju krivulje rasta svakog bakterijskog soja (Slike 12, 13, 14).



Slika 12. Rast probiotičkih sojeva a) *L. helveticus* M92 b) *L. brevis* ZG1 i c) *L. plantarum* D13 u standardnoj MRS tekućoj podlozi pri 37 °C, u MRS tekućoj podlozi pH=3 pri 37 °C, te u standardnoj MRS tekućoj podlozi pri 30 °C i 45 °C



Slika 13. Rast probiotičkih sojeva a) *L. helveticus* M92 b) *L. brevis* ZG1 i c) *L. plantarum* D13 u standardnoj MRS tekućoj podlozi, te u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 4,5 % i 6,5 % NaCl



Slika 14. Rast probiotičkih sojeva a) *L. helveticus* M92 b) *L. brevis* ZG1 i c) *L. plantarum* D13 u standardnoj MRS tekućoj podlozi, te u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 0,5 %, 1 % i 1,5 % žučnih soli

Usporedbom ova 3 soja, najbolju sposobnost rasta u MRS tekućoj podlozi pri 45 °C je pokazao soj *L. helveticus* M92, u MRS tekućoj podlozi pri 30 °C su najbolje rasli sojevi *L. brevis* ZG1 i *L. plantarum* D13 dok su sva tri soja pokazala podjednaku sposobnost rasta u tekućoj podlozi pri pH=3.

Soj *L. brevis* ZG1 je imao jednak rast u MRS podlozi sa 4,5 % NaCl kao i soj *L. plantarum* D13, a najbolje je rastao u MRS podlozi sa 6,5 % NaCl. Soj *L. helveticus* M92 je najlošije rastao u obje podloge.

Soj *L. helveticus* M92 je najbolje rastao u MRS hranjivoj podlozi sa 0,5 %, 1%, 1,5% žučnih soli, zatim *L. plantarum* D13, a najlošije je rastao *L. brevis* ZG1.

Ovi rezultati se djelomično slažu sa istraživanjem koje su proveli Grosu-Tudor i sur. (2016) jer je pokazano da S-proteini imaju zaštitnu ulogu kod sojeva M92 i ZG1 u određenim nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

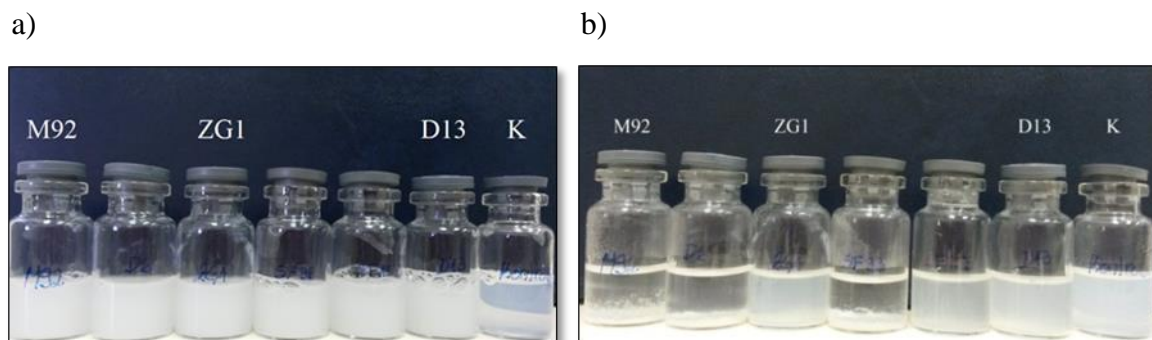
Grosu-Tudor i sur. (2016) su dokazali povećanje ekspresije S-proteina soja *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 kada su stanica tretirane sa NaCl (0.6 % do 3 %) i žučnim solima (0,05% do 0,2 %) pri 42 °C usporedbom sa kontrolnom skupinom koja je uzgajana u optimalnim uvjetima pri 37 °C. Dokazali su dobru izdržljivost stanica u stresnim uvjetima iako se povećanjem stresnih uvjeta ukupan broj stanica smanjivao. Najveće koncentracije S-proteina su nađene kod soja koji je rastao pri 42 °C, kada je u medij za rast dodano 0,05 % žučnih soli ili 2 % NaCl čime su dokazali da u određenim stresnim okolišnim uvjetima može doći do indukcije ekspresije S-proteina, koji vrlo vjerojatno održava vijabilnost stanica u nepovoljnim uvjetima.

4.4. ANALIZA PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI ODABRANIH *Lactobacillus* SOJEVA

Proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline je esencijalna za njihov rast u mlijeku i značajno doprinosi okusu fermentiranih mliječnih proizvoda. Većina BMK izoliranih iz fermentiranih mliječnih proizvoda su auksotrofni mikroorganizmi za određene aminokiseline koji se uzgajaju u podlogama kompleksnog sastava čiji sastav ovisi o ekspresiji kompleksnog proteolitičkog sistema za razgradnju kazeina (Siezen, 1999; Detmers i sur., 1998).

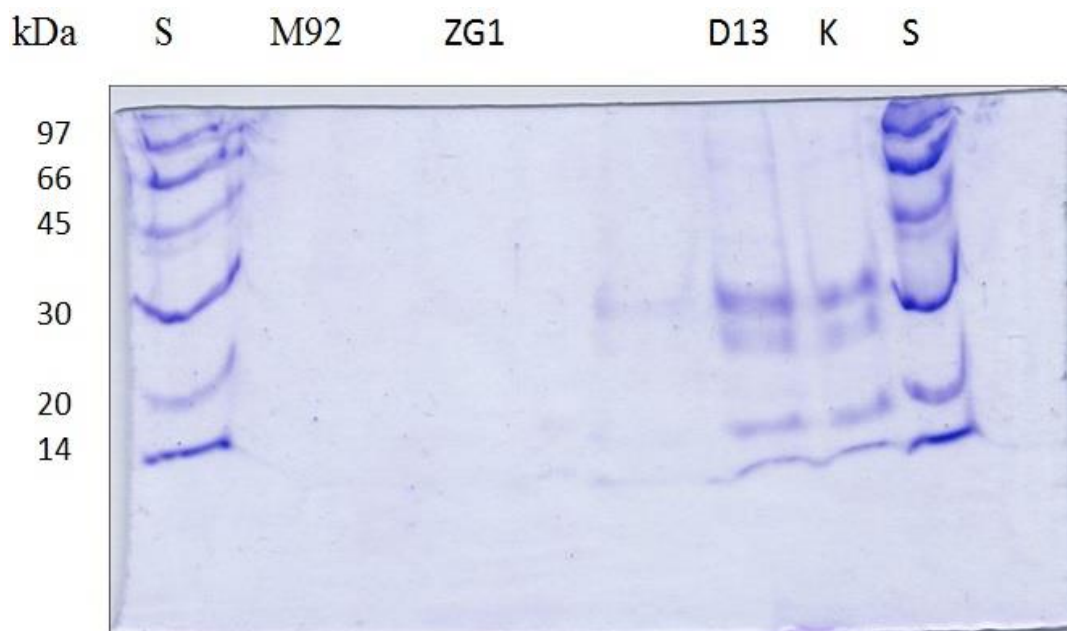
Cilj je bio ispitati proteolitičku aktivnost soja *L. brevis* ZG1, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišten soj *L. helveticus* M92, a kao negativna kontrola *L. plantarum* D13.

Kulture stanica su inkubirane preko noći u otopini obranog mlijeka u svrhu ispitivanja proteolitičke aktivnosti (Slika 15), odnosno provedena je SDS-PAGE elektroforeza supernatanta kultura nakon inkubacije u cilju utvrđivanja prisutnosti glavnog proteina (kazeina) koji se nalazi u obranom mlijeku (Slika 16).



Slika 15. Određivanje proteolitičke aktivnosti u obranom mlijeku uspoređivanjem uzoraka a) prije i b) nakon inkubacije preko noći pri 37 °C

M92 - *Lactobacillus helveticus*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K - otopina obranog mlijeka



Slika 16. Utvrđivanje prisutnosti kazeina u supernatantu nakon inkubacije pomoću odabranih sojeva bakterije mliječne kiseline SDS-PAGE elektroforezom; S- standard proteina niske molekulske mase; M92 - *Lactobacillus helveticus*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K - otopina obranog mlijeka

Iz prikazanih rezultata se može pretpostaviti da soj *L. helveticus* M92 ima proteolitičku aktivnost jer je došlo do bistrenja otopine nakon inkubacije preko noći pri 37 °C (Slika 15). Provođenjem SDS-PAGE elektroforeze na gelu nije vidljiva proteinska vrpca (Slika 16) što potvrđuje pretpostavku da je uslijed djelovanja proteaza ovog soja došlo do razgradnje kazeina zbog čega se on ne može detektirati na gelu. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Beganović i sur. (2013).

Nakon prekonoćne inkubacije došlo je do blagog bistrenja kod soja *L. brevis* ZG1 što upućuje na potencijalnu proteolitičku aktivnost ovog soja (Slika 15). SDS-PAGE elektroforezom su dobiveni isti rezultati kao kod soja *L. helveticus* M92 s obzirom da na gelu nije vidljiva proteinska vrpca (Slika 16). Kako bi se utvrdila potencijalna proteolitička aktivnost ovih sojeva potrebna su daljnja istraživanja jer BMK proizvode mliječnu kiselinu koja snižava pH vrijednost u mlijeku pri čemu može doći do taloženja kazeina i iz tog razloga on nije detektiran u gornjem bistrom dijelu suspenzije.

Soj *L. plantarum* D13 nema proteolitičku aktivnost jer nije došlo do bistrenja, što se vidi i usporedbom sa kontrolom (Slika 15). Na SDS-PAGE gelu kod soja *L. plantarum* D13 se vidi proteinska vrpca (Slika 16) što je dokaz da ovaj soj ne posjeduje proteolitičku aktivnost koja razgrađuje kazein iz obranog mlijeka pri čemu ga možemo detektirati na gelu.

4.5. ADHEZIJA NA MUCIN ODABRANIH *Lactobacillus* SOJEVA

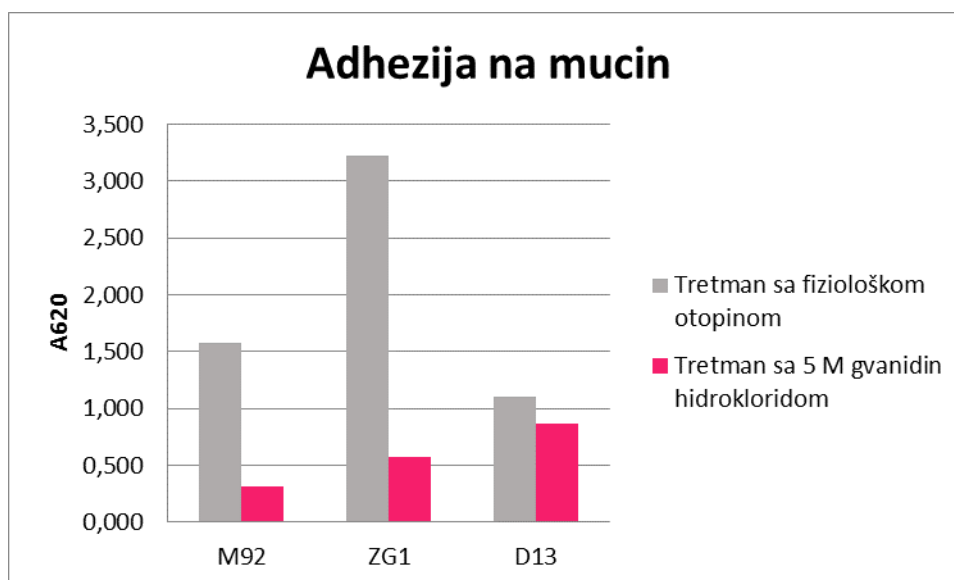
Adhezija na sluznicu crijeva je jedan od glavnih svojstava odabira probiotika jer je potrebna za crijevnu kolonizaciju i također je važna za modulaciju imunološkog sustava i anatagonizam protiv patogena (Van Tassell i Miller, 2011; Bermudez-Brito i sur., 2012). Agregacija i adhezija su složeni procesi koji uključuju nekoliko molekula prisutnih na površini stanične stijenke kao što su: teihoninske, lipoteihoninske kiseline i (gliko)proteini (Li i sur., 2015). S-proteini sudjeluju u auto- ili koagregaciji bakterija, vezanju na različite površine, uključujući gastrointestinalni mucin, makromolekule izvanstaničnog matriksa i epitelne stanice (Sakakibara i sur., 2007; Hynönen i Palva 2013; Shimotahira i sur., 2013; Zhang i sur., 2013), formiranju biofilma i interakciji s imunološkim sustavom.

Adhezija na epitelno i subepitelno tkivo je važan početni korak u uspješnoj kolonizaciji crijeva sisavaca i drugih tkiva. Uloga S-proteina u učinkovitoj adheziji patogenih i nepatogenih bakterija ovisi i o supstratu i o soju (Kos i sur., 2003). Zbog važne uloge soja *Lactobacillus* u kompeticiji s patogenima, intenzivno se proučavala njihova sposobnost

adhezije za proteine izvanstaničnog matriksa kao što su kolagen, laminin, fibronektin, ili fibrinogen (Muñoz-Provencio i sur., 2009). S-proteini se nalaze u nekoliko vrsta bakterija roda *Lactobacillus*. S-proteini su nađeni u: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. helveticus* i *L. hilgardii* i kod bivše *Lactobacillus acidophilus* grupe (Johnson i sur., 1980).

S-proteini se mogu odvojiti s površine Gram-pozitivnih bakterija tretmanom sa visokim koncentracijama gvanidin hidroklorida ili litijevog klorida, koji cijepaju vodikove veze između S-proteina i sekundarne stanične stijenke polisaharida (Sára i Sleytr, 2000).

Iz tog razloga se krenulo u istraživanje prisutnosti S-proteina i sposobnost adhezije soja *Lactobacillus brevis* ZG1, pri čemu se kao pozitivna kontrola koristio soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji sadrži S-proteine, a kao negativna kontrola soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ih ne sadrži.



Slika 17. Ispitivanje *in vitro* adhezije probiotičkih sojeva na mucin prije i nakon uklanjanja površinskih proteina s 5 M gvanidin hidrokloridom; M92 - *Lactobacillus helveticus*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*

U mikrotitarskim pločicama u kojima je apsorbancija uzoraka za svaki od ispitivanih sojeva podešena na $A_{620}=0,5$ nakon provedenog ekperimenta, mjerenja apsorbancije, izračunavanja srednjih vrijednosti i standardne devijacije dobiveni su rezultati prikazani na Slici 17.

Soj *L. helveticus* M92, koji je služio kao pozitivna kontrola, jer sadrži gene čijom ekspresijom, nastaju S-proteini, tretiran sa fiziološkom otopinom je imao veću apsorbanciju u

odnosu na stanice tretirane s gvanidin hidrokloridom (Slika 17) što je u skladu s pretpostavkom da S-proteini uklonjeni GHCl-om služe za adheziju na mucin. Uklanjanjem S-proteina je izmjerena manja apsorbancija jer stanice u odsustvu tog proteina adheziraju manjim intezitetom za mucin.

Soj *L. plantarum* D13 koji je služio kao negativna kontrola, jer ne sadrži gene za ekspresiju S-proteina, tretiran sa fiziološkom otopinom je pokazao neznatno veću apsorbanciju (Slika 17) nego nakon tretmana sa gvanidin hidrokloridom, što je u skladu s pretpostavkom da kod soja *L. plantarum* D13 budući da nema S-proteine, ne dolazi do značajnije promjene u vezanju za mucin. U njegovom vezanju na mucin najvjerojatnije posreduju teihoninske, lipoteihoninske kiseline ili neki drugi proteini odnosno glikoproteini na površini stanica.

Soj čija smo svojstva ispitivali je *L. brevis* ZG1 i on je pokazao slične rezultate kao i soj *L. helveticus* M92, odnosno došlo je do značajnog smanjenja apsorbancije nakon tretmana sa gvanidin hidrokloridom u usporedbi sa tretmanom sa fiziološkom otopinom (Slika 17). Ovi rezultati ukazuju na to da S-proteini soja *L. brevis* ZG1 sudjeluju u adheziji na mucina jer je njihovim uklanjanjem sposobnost adhezije za mucin znatno smanjena.

Ovi rezultati su u skladu s pretpostavkom da vrste *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus brevis* koje imaju S-proteine posjeduju bolja adhezijska svojstva od *Lactobacillus* vrsta kao što je *Lactobacillus plantarum* koja nema S-proteine (Johnson i sur., 1980).

5. ZAKLJUČCI

1. DGGE analizom je moguće razlikovati vrste unutar roda *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus plantarum* D13, te *Lactobacillus helveticus* M92.
2. Korištenjem različitih koncentracija litijevog klorida se mogu odvojiti S-proteini od proteina koji su na njih vezani (tzv. SLAP proteini), što je dokazano za ispitivani soj *L. brevis* ZG1, kao i za pozitivnu kontrolu *L. helveticus* M92.
3. Turbidimetrijskim određivanjem brzine rasta kultura u različitim stresnim uvjetima dokazano je da ispitivani soj *L. brevis* ZG1 ima dobru sposobnost rasta u kiselom pH (pH=3) i u MRS podlozi sa NaCl (4,5 % i 6,5%), dok je u MRS hranjivoj podlozi sa žučnim solima (0,5 %, 1%, 1,5%) najlošije rastao od svih ispitivanih sojeva. Soj *L. helveticus* M92 je imao dobru sposobnost rasta pri povišenoj temperaturi, u kiselim uvjetima i u hranjivoj podlozi sa žučnim solima, ali ne i u podlozi sa NaCl-om. Soj *L. plantarum* D13 je imao dobru sposobnost rasta u kiselim uvjetima kao i u podlozi sa 4,5 % NaCl.
4. Analizom proteolitičke aktivnosti dokazano je da soj *L. brevis* ZG1 ima proteolitičku aktivnost kao i kontrolni soj sa slojem S-proteina *L. helveticus* M92, dok kod soja *L. plantarum* D13 koji služi kao negativna kontrola za ekspresiju S-proteina, proteolitička aktivnost nije dokazana.
5. Soj *Lactobacillus brevis* ZG1, koji eksprimira S-proteine, uspješno se adhezira na mucin. Budući da je njegova adhezija nakon uklanjanja S-proteina s površine stanica bila znatno smanjena, dokazana je uloga S-proteina u adhezijskim svojstvima toga soja.

6. LITERATURA

Arauz, L.J., Jozalaa, A.F., Mazzolab, P.G., Vessoni, Penna, T.C. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 146–154.

Ashida, N., Yanagihara, S., Shinoda, T., Yamamoto, N. (2011) Characterization of adhesive molecule with affinity to Caco-2 cells in *Lactobacillus acidophilus* by proteome analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 333-337.

Åvall-Jääskelläinen, S., Palva, A. (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *Fems. Microbiol. Rev.* **29**, 511-529.

Bajaj, B.K., Razdan K., Claes I.J.J., Lebeer, S. (2014) Probiotic attributes of the newly isolated lactic acid bacteria from infants' gut. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **5**, 109-115.

Bajaj, B.K, Claes, I.J.J., Lebeer, S. (2015) Functional mechanisms of probiotics. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **4**, 321-327.

Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A. L., Habjanič, K., Šušković, J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **100**, 43-53.

Beganović, J., Kos, B., Leboš-Pavunc, A., Uroić, K., Džidara, P., Šušković, J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe* **20**, 58-64.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012) Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab.* **61**, 160–174.

Blaut, M., Klaus, S. (2012) Intestinal microbiota and obesity. *Handb. Exp. Pharmacol.* **209**, 251–273.

Boot, H. J., Pouwels, P. H. (1996) Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Mol. Microbiol.* **21**, 1117-1123.

Bujalance, C., Jiménez-Valera, M., Moreno, E., Ruiz-López, M.D., Lasserrot, A., Ruiz-Bravo, A. (2014) Lack of correlation between in vitro antibiosis and in vivo protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. *Res. Microbiol.* **165**, 1420.

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., Chadee, K. (2007) The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G315–G322.

Ceapa, C., Wopereis, H., Rezaïki, L., Kleerebezem, M., Knol, J., Oozeer, R. (2013) Influence of fermented milk products, probiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 139-155.

Champagne, C.P., Roy, D., Gardner, N. (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. FoodSci. Nutr.* **45**, 61–84.

Claus, H., Akca, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.P., König, H. (2002) Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 3–12.

Collado, M.C., Gueimonde, M., Sanz, Y., Salminen, S. (2006) Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *J. Food Prot.* **69**, 1675–1679.

Cruz, A.G., Antunes, A.E.C., Sousa, A.L.P., Faria, J.A.F., Saad, S.M.I. (2009) Ice-cream as probiotic food carrier. *Food Res. Int.* **42**, 1233–1239.

Daneshi, M., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Labbafi, M. (2013) Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. *Electron. J. Biotechnol.* **16**, 1–12.

Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. (2014) Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poult Sci.* **93**, 2464-2472.

Detmers, F., Kunji, E., Lanfermeijer, F., Poolman, B., Konings, W. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **37**, 16671-9.

Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., Morelli, L. (2000) Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 695–703.

Engelhardt, H. (2007) Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: a theoretical study. *J. Struct. Biol.* **160**, 190–199.

Engelhardt, H., Peters, J. (1998) Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. *J. Struct. Biol.* **124**, 276–302.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) (2001) Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina. str. 19–20.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005) Importance of S layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 285–292.

Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365–378.

Geier, M.S., Butler, R.N., Howarth, G.S. (2006) Probiotics, prebiotics and synbiotics. A role in chemoprevention of colorectal cancer? *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1265–1269.

Gill, H.S., Guarner, F. (2004) Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad. Med. J.* **80**, 516-26.

Goh, Y. J., Azcarate-Peril, M. A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S., Klaenhammer, T. R. (2009) Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 3093-3105.

Grewal, I.S., Flavell, R.A. (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 111–135.

Grosu-Tudor, S.S., Brown, L. Hebert, E.M., Brezeanu, A., Brinzan, A., Fadda, S., Mozzi, F., Zamfir, M. (2016) S-layer production by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 under environmental stress conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 4573-4583.

Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., Khosroushahi, A.Y. (2014) Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. Lactis 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe* **30**, 51-59.

Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*. U: The Genera of Lactic Acid Bacteria, (Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H.), Blackie Academic & Professional, Glasgow, U.K., str. 19-54.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F. (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 723-726.

Hirayama, K., Rafter, J. (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* **2**, 681–686.

- Hyland, N.P., Quigley, E.M., Brint, E. (2014) Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: Epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions. *World J. Gastroenterol.* **20**, 8859-8866.
- Hynönen, U., Palva, A. (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225–5543.
- Johnson, B., Selle, K., O'Flaherty, S., Goh, Y.J., Klaenhammer, T. (2013) Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology* **159**, 2269–2282.
- Johnson, J.L., Phelps, C.F., Cummins, C.S., London, J., Gasser, F. (1980) Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 53–68.
- Kailasapathy, K., Harmstorf, I., Phillips, M. (2008) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT-Food Sci. Technol.* **41**, 1317–1322.
- Karimi, R., Mortazavian, A.M., Cruz, A.G.D. (2011) Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 283–308.
- Kaur, I.P., Kuhad, A., Garg, A., Chopra, K. (2009) Probiotics: Delineation of Prophylactic and Therapeutic Benefits. *J. Med. Food* **12**, 219–235.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981–987.
- Li, Q., Liu, X., Zhou, J., Wang, Y. (2015) Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int. J. Agric. Policy. Res.* **3**, 84–92.

Lin, C.S., Chang, C.J., Lu, C.C., Martel, J., Ojcius, D.M., Ko, Y.F., Young, J.D., Lai, H.C. (2014) Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed. J.* **37**, 259–268.

Liong, M.T. (2011) Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects. Microbiology Monographs. Heidelberg, Springer.

Liu, Z., Qin, H., Yang, Z., Xia, Y., Liu, W., Yang, J., Jiang, Y., Zhang, H., Yang, Z., Wang, Y., Zheng, Q. (2011) Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery -a double-blind study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33**, 50-63.

Lortal, S., Vanheijenoort, J., Gruber, K., Sleytr, U. B. (1992) S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 611-618.

Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., de Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., Monedero, V. (2009) Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.* **191**, 153–161.

Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. (2009) Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 300-310.

Nielsen, D.S., Cho, G.S., Hanak, A., Huch, M., Franz, C.M., Arneborg, N. (2010) The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, S53–S59.

O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C. (2012) Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **152**, 189–205.

Ohland, C.L., MacNaughton, W.K. (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G807-819.

Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., Wiele, T.V. (2010) Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 97–103.

Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., Schleifer, K. H. (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. U: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, (De Vuyst, L., Vandamme, E.J.), Chapman & Hall, Glasgow, U.K., str. 13-90.

Prince, T., McBain, A.J., O'Neill, C.A. (2012) *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5119-26.

Rad, A.H., Mehrabany, E.V., Alipoor, B., Mehrabany, L.V. (2014) The comparison of food and supplement as probiotics delivery vehicles. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 896-909.

Ranadheera, R.D.S.C., Baines, S.K. Adams, M.C. (2010) Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* **43**, 1–7.

Rautava, S., Collado, M.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2012) Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatal.* **102**, 178–184.

Razdan, K., Parihar, J., Bajaj, B.K. (2012) Isolation and characterization of a lipolytic and phytase producing probiotic for potential application in poultry feed. *Online J. Anim. Feed Res.* **2**, 369-377.

Rupa, P., Mine, Y. (2012) Recent advances in the role of probiotics in human inflammation and gut health. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8249-56.

Sakakibara, J., Nagano, K., Murakami, Y., Higuchi, N., Nakamura, H., Shimoizato, K., Yoshimura, F. (2007) Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology* **153**, 866–876.

Sanders, M.E., Lenoir-Wijnkoop, I., Salminen, S., Merenstein, D.J., Gibson, G.R., Petschow, B.W., Nieuwdorp, M., Tancredi, D.J., Cifelli, C.J., Jacques, P., Pot, B. (2014) Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1309**, 19-29.

Sára, M., Sleytr, U.B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859–868.

Sawada, N., Murata, M., Kikuchi, K., Osanai, M., Tobioka, H., Kojima, T., Chiba, H. (2003) Tight junctions and human diseases. *Med. Electron. Microsc.* **36**, 147-56.

Schiffrin, E.J., Blum, S. (2001) Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 499-502.

Schrezenmeir, J., De Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *Am. J Clin. Nutr.* **73**, 361–364.

Shimotahira, N., Oogai, Y., Kawada-Matsuo, M., Yamada, S., Fukutsuji, K., Nagano, K., Yoshimura, F., Noguchi, K., Komatsuzawa, H. (2013) The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infect. Immun.* **81**, 1198–1206.

Siezen, R. (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **76**, 139-55.

Sleytr, U.B., Beveridge, T.J. (1999) Bacterial S-layers. *Trends Microbiol.* **7**, 253–260.

Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B. (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci.* **68**, 231–278.

Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B., Pouwels, P. H. (2001) The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J. Mol. Biol.* **305**, 245-257.

Smug, L.N., Salminen, S., Sanders, M.E., Ebner, S. (2014) Yoghurt and probiotic bacteria in dietary guidelines of the member states of the European Union. *Benef. Microbes.* **5**, 61-66.

Sun, J., Le, G.W., Shi, Y.H., Su, G.W. (2007) Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 79-85.

Taverniti, V., Stuknyte, M., Minuzzo, M. i ostali autori (2013) S-layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. *Appl. Environ. Microb.* **79**, 1221-1231.

Timmermana, H.M., Koningb, C.J.M., Mulderc, L., Romboutsd, F.M., Beynena, A.C. (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 219–233.

Tooley, K., Howarth, G., Lymn, K., Lawrence, A., Butler, R. (2006) Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 593–600.

Tsai, Y.T., Cheng, P.C., Pan, T.M. (2012) The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 853-862.

Van Hemert, S., Verwer, J., Schütz, B. (2013) Clinical Studies Evaluating Effects of Probiotics on Parameters of Intestinal Barrier Function. *Adv. Microbiol.* **3**, 212-221.

Van Baarlen, P., Troost, F., Vandermeer, C., Hooiveld, G., Boekschoten, M., Brummer, R.J.M., Kleerebezem, M. (2011) Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4562–4569.

Van Guelpen, B., Hultdin, J., Johansson, I., Hallmans, G., Stenling, R., Riboli, E., Winkvist, A., Palmqvist, R. (2006) Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* **55**, 1461–1466.

Van Tassell, M.L., Miller, M.J. (2011) *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* **3**, 613–636.

Woo, J., Ahn, J. (2013) Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **56**, 307-13.

Zhang, W., Wang, H., Liu, J., Zhao, Y., Gao, K., Zhang, J. (2013) Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe*, **22**, 1–7.